



UNIVERSIDAD DE ALMERÍA

Departamento de Hidrogeología y Química Analítica

**Máster Universitario Oficial en Residuos de Plaguicidas y
Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental**

**Trabajo Fin de Máster:
“Determinación de nitrofuranos en productos alimenticios del mar”**

Noelia M^a Valera Tarifa

Julio 2011

TRABAJO FIN DE MÁSTER

El presente trabajo, realizado por Noelia M^a Valera Tarifa, se ha presentado para la obtención del Título correspondiente al Máster “Residuos de Plaguicidas y contaminantes. Control Alimentario y Ambiental”, incluido dentro del programa de Másteres Universitarios Oficiales.

Fdo. Noelia M^a Valera Tarifa

Tutores: Patricia Plaza Bolaños y Roberto Romero González

Fdo. Patricia Plaza Bolaños

Fdo. Roberto Romero González

ÍNDICE

II. MEMORIA CIENTÍFICA	8
1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN.....	8
2. INTRODUCCIÓN.....	9
2.1. El problema analítico.....	9
2.2. Legislación vigente.....	12
2.3. Técnicas analíticas para la determinación de nitrofuranos	13
2.3.1. <i>Técnicas de extracción y tratamiento de la muestra</i>	14
2.3.2. <i>Técnicas para la determinación de nitrofuranos</i>	19
3. EXPERIMENTAL	27
3.1. Reactivos y materiales	27
3.2. Instrumentos y aparatos	28
3.3. Procedimiento de extracción	28
3.4. Análisis mediante UHPLC-QqQ-MS/MS	29
3.5. Muestras	30
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
4.1. Optimización de las condiciones espectrométricas y cromatográficas	31
4.1.1. <i>Metabolitos de los nitrofuranos sin derivatizar</i>	31
4.1.2. <i>Metabolitos de los nitrofuranos derivatizados</i>	33
4.2. Optimización de la derivatización de los metabolitos de los nitrofuranos	38
4.3. Optimización del procedimiento de extracción	40
4.3. Validación del método analítico mediante UHPLC-QqQ-MS/MS	47
5. CONCLUSIONES.....	51
6. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO.....	52
7. REFERENCIAS	53

I. PRESENTACIÓN

El Máster “Residuos de Plaguicidas y Contaminantes. Control Alimentario y Ambiental”, realizado en el curso 2010/2011, se encuentra estructurado en cinco módulos y 60 créditos ECTS. Los tres primeros módulos están dedicados al aprendizaje de contenidos mayoritariamente teóricos, el cuarto de ellos presenta un carácter práctico y el último de los módulos abarca el desarrollo del Trabajo Fin de Máster.

Este Máster ha sido seleccionado, además, por parte del Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) del Gobierno Español para el Programa Pablo Neruda de movilidad académica con países latinoamericanos.

A continuación, se procede a la realización de una breve descripción del contenido comprendido en cada uno de los cinco módulos:

Módulo 1 – Plaguicidas

Está constituido por las siguientes asignaturas:

- Plaguicidas. Aplicaciones y tendencias (3 créditos, cursada).
- Políticas de seguridad alimentaria (3 créditos, cursada).
- Registro de plaguicidas (3 créditos, cursada).
- Formulaciones de plaguicidas. Liberación controlada (3 créditos, cursada).

El Máster comenzó con el estudio de las técnicas y equipos de aplicaciones de fitosanitarios y con una revisión genérica a las propiedades de plaguicidas y otros contaminantes. Este módulo ha estado dedicado, además, a la adquisición de una perspectiva general sobre el conjunto de políticas, normas y decretos aplicados al control de residuos de plaguicidas y contaminantes en productos alimenticios, a nivel internacional, nacional y autonómico. Además, se han abordado los objetivos y procedimientos focalizados al registro de plaguicidas, dentro del marco normativo y administrativo de España y Europa. Se han estudiado por último, los tipos y aplicaciones de las formulaciones de liberación controlada de plaguicidas, abordándose aspectos relacionados con la eficacia y el impacto medioambiental de éstas.

Módulo 2 – Contaminantes

- Calidad y trazabilidad alimentaria (3 créditos, cursada).
- Contaminantes. Significación alimentaria y ambiental (3 créditos, cursada).
- Contaminación y remediación de suelos (3 créditos, cursada).

En este módulo se ha llevado a cabo un amplio recorrido por los sistemas de gestión de la calidad y seguridad alimentaria, el fraude alimentario y las estrategias analíticas para detectarlo, además de adentrarnos en los sistemas de trazabilidad alimentaria y su marco legislativo. Por otro lado, también se han adquirido conocimientos en el ámbito de la toxicología general, haciendo un mayor hincapié en lo que a toxicología alimentaria y ambiental se refiere. En último lugar, se ha sometido a estudio, de forma genérica, la constitución del suelo y los procesos de contaminación y remediación relacionados con éste.

Módulo 3 – Gestión de laboratorios

- Muestreo. Preparación de muestras (3 créditos, cursada).
- Tratamiento de datos analíticos. Control de calidad (3 créditos, cursada).
- Gestión de la calidad en laboratorios (3 créditos, cursada).

En este módulo se ha puesto de manifiesto la importancia de la etapa de muestreo y el tratamiento de la muestra en el problema analítico. Paralelamente, se han adquirido conocimientos sobre los tipos de muestreo, la incertidumbre asociada a éste, el diseño de un plan de muestreo y la legislación relacionada con este tema. Se ha estudiado, además, la clasificación metrológica de los métodos analíticos, los parámetros de validación de los métodos de análisis y los controles de calidad interno y externo aplicados a dichos métodos. Finalmente, en este módulo se ha tratado el tema de los sistemas de gestión de calidad, del personal y equipos en un laboratorio, y de los procedimientos para evaluación de la calidad.

Módulo 4 – Experimentación en Técnicas Cromatográficas

- Espectrometría de masas (3 créditos, cursada).
- Exposición a plaguicidas (3 créditos, cursada).

- Experimentación en técnicas cromatográficas (9 créditos, cursada).

En este módulo se ha adquirido una base general sobre la espectrometría de masas, acerca de las diferentes fuentes de ionización, analizadores y detectores empleados, modos de operación, criterios de identificación y modos de cuantificación para desarrollar métodos analíticos para contaminantes orgánicos. Se ha llevado a cabo un recorrido por las diversas metodologías analíticas existentes para evaluar los riesgos de la exposición humana a los plaguicidas que se emplean en cultivos intensivos. Y mediante clases teóricas y prácticas, se han adquirido, por último, conocimientos para la utilización de la cromatografía (de gases y de líquidos), acoplada a detectores convencionales y de masas.

Módulo 5 – Trabajo Fin de Máster (15 créditos)

El Trabajo Fin de Máster “Determinación de nitrofuranos en productos alimenticios del mar”, ha sido desarrollado dentro del Grupo de Investigación “*Química Analítica de Contaminantes*” (FQM-170), perteneciente al Departamento de Hidrogeología y Química Analítica de la Universidad de Almería.

A lo largo de la realización de este trabajo de investigación he adquirido conocimientos y habilidades para:

- Búsqueda de legislación e información bibliográfica previa al desarrollo de un trabajo de investigación.
- Planificación y realización de estudios científicos relacionados con la presencia de residuos de antibióticos en alimentos.
- Desarrollo y validación de métodos analíticos mediante cromatografía de líquidos de ultra presión acoplada a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (UHPLC-QqQ-MS/MS).
- Aplicación de diversas técnicas de tratamiento de muestra y optimización del método de extracción.
- Tratamiento de datos durante la validación del método analítico, etapa durante la cual se ha procesado, evaluado, sintetizado y extraído conclusiones de la información obtenida.

En resumen, la adquisición de todos estos conocimientos me permiten poseer la aptitud necesaria para la planificación, documentación, desarrollo, validación y aplicación, de manera autónoma, de métodos analíticos focalizados al análisis de residuos y contaminantes en muestras alimentarias.

Por último, considero preciso mencionar que el estudio de todas las materias ofertadas por este Máster, así como la realización del Trabajo Fin de Máster, me ha facilitado adquirir competencias, tales como la capacidad de planificación y organización basadas en criterios de calidad y eficacia. Y estas competencias adquiridas, las considero fundamentales para el inicio de mi desarrollo profesional en el ámbito científico.

II. MEMORIA CIENTÍFICA

1. OBJETO Y CAMPO DE APLICACIÓN

En las últimas décadas, debido al crecimiento continuo del comercio internacional de los productos procedentes de la acuicultura, de la expansión de la variedad de especies acuáticas criadas, y del aumento de las enfermedades (debido al crecimiento de la acuicultura intensiva y la globalización de los mercados), se ha necesitado un uso más extendido de los medicamentos veterinarios y productos químicos. Sin embargo, estos compuestos de uso frecuente, empleados como aditivos para piensos o agentes profilácticos y terapéuticos, pueden suponer un peligro potencial para la salud humana.

Este trabajo tiene como objetivo el desarrollo de un método analítico para la determinación del grupo de antibacterianos denominado nitrofuranos en productos alimenticios procedentes del mar mediante UHPLC-QqQ-MS/MS. A tal fin, se han seguido los siguientes pasos:

1. Desarrollo de un método instrumental adecuado para determinar los nitrofuranos mediante UHPLC-QqQ-MS/MS.
2. Optimización de un procedimiento de derivatización y extracción adecuado, prestando especial atención a la reducción del tiempo de análisis y a la sensibilidad del método analítico.
3. Validación del método analítico optimizado.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. El problema analítico

En el último siglo se ha producido un incremento de la demanda de productos del mar, lo que ha impulsado el desarrollo y crecimiento a gran escala de la acuicultura moderna debido a la sobreexplotación y consecuente agotamiento de las reservas naturales de pescado [1]. Uno de los aspectos principales que caracterizan la producción acuícola o en piscifactoría es el uso intensivo de piensos formulados que contienen antibióticos, antifúngicos y otros productos farmacéuticos, además del empleo de plaguicidas y desinfectantes. Los antibióticos en particular, son un grupo de compuestos naturales o sintéticos que destruyen bacterias (bactericidas) o inhiben su crecimiento (bacteriostáticos), y que son usados principalmente como agentes terapéuticos y profilácticos en la acuicultura [2]. Sin embargo, la administración asidua y extensiva de medicamentos veterinarios al pescado o productos del mar destinados al consumo humano puede suponer un serio problema debido a que los antibióticos utilizados pueden persistir en el tejido animal como residuos y en consecuencia, llegar al consumidor final. Estos antibióticos pueden ser intrínsecamente tóxicos o representar una fuente de resistencia para los patógenos humanos, implicando así un riesgo para la salud humana [3]

Por ello, actualmente existe una estricta legislación para controlar el empleo de dichas sustancias, con el objetivo de minimizar el riesgo para la salud humana asociado al consumo de sus residuos. Así, la Unión Europea (UE) ha establecido límites de tolerancia para esos compuestos en forma de límites máximos de residuos (LMRs) o de límites mínimos de funcionamiento exigidos (*Minimum Required Performance Level*, MRPLs) para los métodos de análisis.

Según el Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) de la UE [4, 5], en 2009 la mayoría de las notificaciones sobre la detección de residuos de medicamentos veterinarios en la UE correspondieron concretamente a metabolitos de nitrofuranos, una familia de antibióticos detectada sobre todo en crustáceos, y dentro de éstos, especialmente en gambas. Según los datos disponibles, el número de notificaciones ha sufrido un significativo incremento con respecto al año 2008 [6]. Esto último, unido a la naturaleza carcinogénica y mutagénica de los nitrofuranos, ha

impulsado la prohibición del uso de estos compuestos en la UE [7, 8], promoviendo la necesidad de desarrollar nuevos métodos analíticos a fin de detectar, en particular, la presencia de los nitrofuranos y sus metabolitos en productos del mar.

Los nitrofuranos (Figura 1), clasificados como subgrupo específico dentro de los agentes coccidiostáticos [9], son agentes quimioterapéuticos sintéticos de amplio espectro antimicrobiano, activos frente bacterias gram-positivas (tales como *Staphylococcus* o *Streptococcus*), bacterias gram-negativas (tales como *Escherichia Coli* o *Salmonella*,) y algunos protozoos (tales como *Giardia* o *Histomonas meleagridis*). Su primera acción es bacteriostática, pero a altas dosis también pueden ejercer de bactericidas [10], dependiendo sus propiedades antibacterianas del grupo nitro (-NO₂) que poseen enlazado al C5 del anillo furano [11].

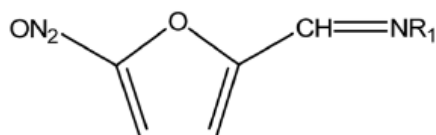


Figura 1. Estructura general de los nitrofuranos.

Dentro de los nitrofuranos destacan, por su mayor importancia, la furazolidona (FZD), la furaltadona (FTD), la nitrofurazona (NFZ) y la nitrofurantoína (NFT). Estos compuestos fueron usados ampliamente durante cinco décadas para el control bacteriano y de protozoos, en infecciones gastrointestinales y respiratorias, y como aditivos en los piensos ejerciendo de promotores del crecimiento [7], debido a su bajo coste, su genérica disponibilidad y su gran eficacia en el tratamiento de infecciones resistentes. Los nitrofuranos se aplicaron con tales fines, principalmente, en ganado (p. ej. aves de corral, cerdo y vacas), acuicultura (p. ej. pescado y gamba) y en colonias de abejas, hasta su prohibición en la UE entre los años 1993 [12] y 1995 (FZD) [13] debido a su toxicidad. De hecho, en lo que a las propiedades toxicológicas de estos compuestos se refiere, se ha observado actividad mutagénica tanto en levaduras y hongos, como en bacterias. Además, los nitrofuranos se han comportado como mutagénicos en ratas y ratones, y citotóxicos en células de mamíferos en cultivo (in vitro) [14-18]. El carácter carcinogénico y mutagénico de estos agentes coccidiostáticos ha sido, por ello, ampliamente investigado [19-23]. Por otro lado, cabe citar que los nitrofuranos, FZD, FTD, NFZ y NFT, se metabolizan rápidamente transformándose en sus metabolitos: 3-

amino-2-oxazolidinona (AOZ), 3-amino-5-morfolinometil-1,3-oxazolidinona (AMOZ), semicarbazida (SEM) y 1-aminohidantoin (AHD), respectivamente (Figura 2).

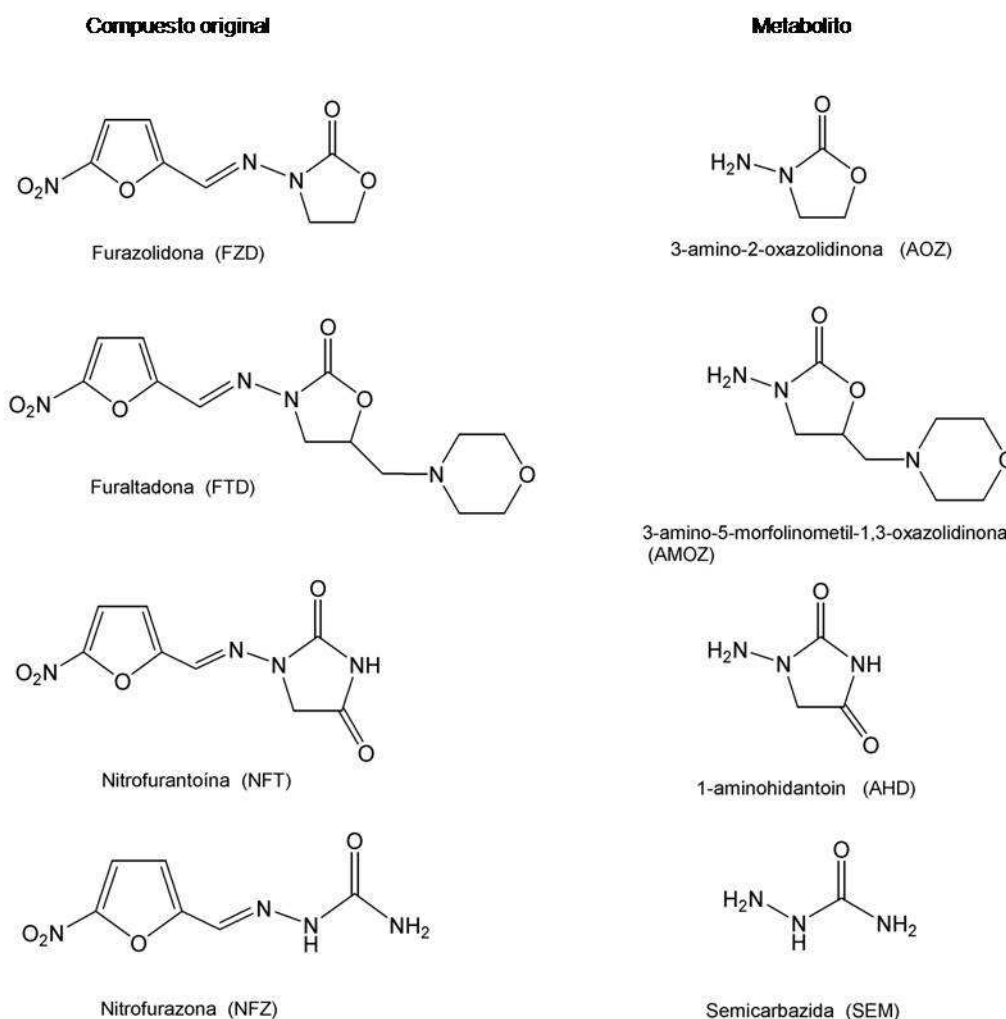


Figura 2. Estructuras químicas de los nitrofuranos y sus correspondientes metabolitos.

Estos metabolitos se enlazan fuertemente a las proteínas y son altamente persistentes en los tejidos animales. A pesar de que el metabolismo de los nitrofuranos no está bien documentado, es importante tener presente que estos derivados aún conservan ciertas cadenas procedentes de los compuestos de partida, lo cual puede provocar que mantengan su toxicidad en el caso de que sean liberados de sus enlaces con las proteínas bajo las condiciones de acidez del estómago [19, 24]. Por tanto, debido a su rápido metabolismo, los nitrofuranos presentan una vida media corta, lo que determina la rápida eliminación de estos compuestos en sangre y tejidos. Sin embargo, debido a que después del tratamiento, los metabolitos formados (AOZ, AMOZ, AHD y SEM)

permanecen estables enlazados a las proteínas en el organismo durante muchas semanas e incluso meses, el análisis de los nitrofuranos suele estar basado en la determinación de dichos metabolitos [25]. Es importante, por tanto, resaltar que cuando en el presente estudio se habla de nitrofuranos, se está refiriendo a los metabolitos formados en el organismo

2.2. Legislación vigente

A pesar de su uso frecuente, son relativamente pocos los medicamentos aprobados para su empleo en acuicultura, lo que acentúa el riesgo que supone su uso ilegal o en exceso. En consecuencia, el empleo de medicamentos veterinarios está regulado por parte del Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo de la UE [26], y más recientemente, por el Reglamento (UE) N° 37/2010 [27], que describen el procedimiento para establecer los LMRs de las sustancias farmacológicamente activas en alimentos de origen animal.

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), comité científico internacional de expertos administrado conjuntamente por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de la Salud), incluye a los nitrofuranos en un reducido grupo de medicamentos veterinarios para los que no se han recomendado LMR, debido a preocupaciones específicas relativas a la salud humana [28]. Además, la Comisión del Codex Alimentarius (creada en 1963 por la FAO y la OMS para el desarrollo de normas alimentarias, reglamentos y otros textos relacionados), no incluye a los nitrofuranos en el documento que refleja el compendio de métodos de análisis identificados como idóneos para respaldar los LMR, elaborado por el Comité del Codex sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos [29]. De hecho, los nitrofuranos han sido prohibidos como medicamentos veterinarios en la UE y en los Estados Unidos (EEUU) [30] debido a su ya mencionada actividad carcinogénica y genotóxica [7, 8]. Así, los nitrofuranos FZD, NFT y NFZ aparecen en la lista de los 65 compuestos considerados como carcinogénicos o que generan una toxicidad reproductiva en el estado de California [31]. Por ello, estos compuestos fueron incluidos en el Anexo IV del Reglamento (CEE) N° 2377/90 del Consejo de la UE, siendo ubicados dentro de la lista de sustancias farmacológicamente activas para las que no puede establecerse límite

máximo alguno, estableciéndose por tanto, una “tolerancia cero” a estos compuestos y sus metabolitos [26]. De acuerdo con esta “tolerancia cero” en animales destinados al consumo humano, cualquier concentración confirmada de cualquiera de los metabolitos de los nitrofuranos supone un incumplimiento de la legislación vigente. Recientemente, estos compuestos han sido clasificados como sustancias prohibidas en el Reglamento (UE) N° 37/2010 [27].

En 1993, la UE prohibió el empleo de FTD, NFT y NFZ en los animales de producción alimentaria [12], mientras que para la FZD se estableció un LMR provisional de 5 µg/kg en todos los animales productores de alimentos. No obstante, dicho LMR se prolongó hasta 1995, año en el cual la FZD también fue incluida en el Anexo IV del Reglamento (CEE) 2377/90 del Consejo [13, 26]. Por tanto, a partir de enero de 1997 la utilización de todos los nitrofuranos como medicamentos veterinarios quedó totalmente prohibida en la UE.

Sin embargo, es necesario establecer progresivamente MRPLs de los métodos analíticos aplicables a sustancias para las que no se ha establecido un límite permitido y, concretamente, a sustancias cuyo uso no está autorizado ni están específicamente prohibidas por la UE. Por ello, se fijó un MRPL de 1 µg/kg para cada metabolito de los nitrofuranos en carne de aves de corral y productos de la acuicultura, de acuerdo con la Decisión de la Comisión 2003/181/CE [32] que modifica la Decisión 2002/657/CE [33]. Conforme a esta legislación, se requiere que el método sea capaz de cuantificar valores de concentración por encima de 1 µg/kg, pero la mínima concentración que debe ser cuantificada no se especifica. Por lo tanto, el objetivo de los métodos analíticos debe ser conseguir el límite de cuantificación más bajo posible.

2.3. Técnicas analíticas para la determinación de nitrofuranos

Como se ha comentado previamente, debido a su rápido metabolismo, la mayoría de los métodos de análisis de nitrofuranos se basan en la determinación de sus metabolitos, que son pequeñas especies moleculares enlazadas al tejido. Así pues, en bibliografía aparece también registrado, aunque con menor frecuencia, el análisis directo de los nitrofuranos (FZD, NFZ, FTD y NFT) [34, 35]. A fin de justificar experimentalmente la tendencia a analizar los metabolitos enlazados al tejido en lugar de los compuestos padre (cuando se pretende determinar los nitrofuranos en muestras alimentarias), se han

llevado a cabo estudios sobre la permanencia y disminución con el transcurso del tiempo de los nitrofuranos y sus metabolitos en matrices alimentarias. Por ejemplo, este estudio se llevó a cabo en pescado, después de suministrar a los animales una dosis oral conocida de estos compuestos [36]. Los resultados obtenidos reflejaron la ya conocida rápida eliminación de los compuestos padre en el músculo de pescado, de modo que las concentraciones de nitrofuranos presentes en el tejido se encontraron por debajo del límite de detección del método a las 96 h de ser suministrados oralmente. Por el contrario, los metabolitos enlazados al tejido pudieron ser medidos hasta 56 días después de la administración de la dosis [36].

2.3.1. Técnicas de extracción y tratamiento de la muestra

En términos generales, en los recursos bibliográficos consultados, en el análisis de metabolitos de nitrofuranos la preparación de la muestra implica una primera etapa de homogeneización, un procedimiento habitualmente simultáneo de hidrólisis ácida y derivatización y una posterior etapa de extracción. En general, para evitar la fotodegradación de los compuestos, se recomienda protegerlos de la luz durante todo el proceso [24].

En primer lugar, previamente a la etapa de derivatización, es necesario liberar los metabolitos enlazados a las proteínas, llevando a cabo para ello una hidrólisis de la muestra homogeneizada bajo condiciones ácidas suaves (Figura 3a), añadiéndose habitualmente ácido clorhídrico diluido a la muestra homogeneizada [25].

De forma simultánea, a fin de determinar estos compuestos, es necesario incrementar la masa molecular para mejorar la sensibilidad de la detección [37], por lo que se lleva a cabo la derivatización del grupo amino libre de los analitos (Figura 3b), generalmente empleando como agente derivatizante el 2-nitrobenzaldehído, 2-NBA (Figura 4). El tiempo de reacción con el 2-NBA es largo, habitualmente toda la noche o aproximadamente unas 15 h, favoreciéndose con agitación en un baño de agua, en la oscuridad a unos 37°C.

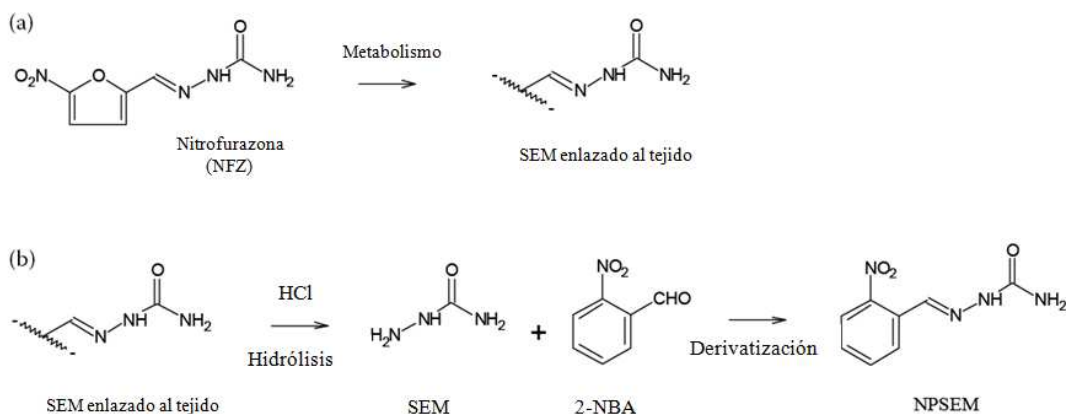


Figura 3. (a) Formación in vivo del metabolito SEM enlazado al tejido; (b) liberación del metabolito SEM enlazado bajo condiciones suaves de acidez y posterior derivatización.

En bibliografía se menciona también la opción de llevar a cabo la reacción con 2-NBA durante 4 h, aumentando para ello la temperatura a 55°C en el baño de agua [38], aunque dicho procedimiento sólo se ha descrito en el mencionado trabajo.

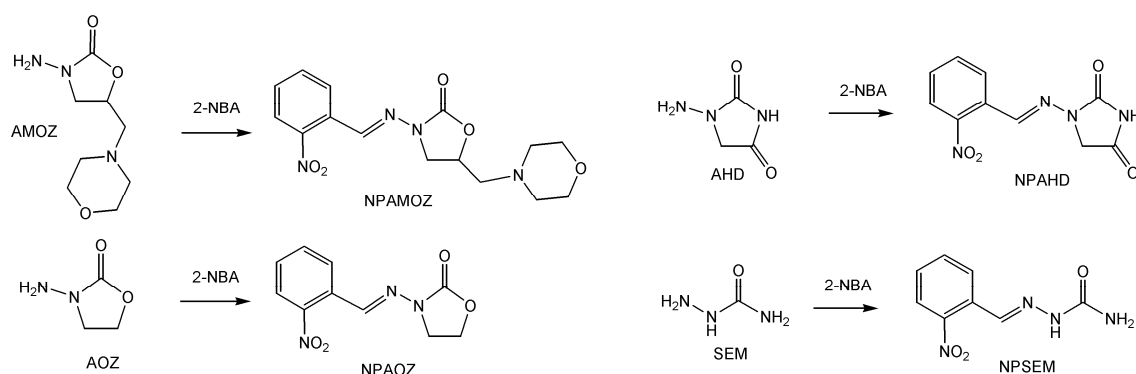


Figura 4. Reacción de derivatización con 2-NBA para cada uno de los metabolitos de los nitrofuranos.

Adicionalmente, a fin de acortar el tiempo de reacción y/o incrementar la sensibilidad de la detección, se ha investigado el uso de otros aldehídos aromáticos (3-piridina carboxaldehído, 2,4-dinitrobenzaldehído, 2-hidroxi-5-nitrobenzaldehído) para llevar a cabo la reacción de derivatización. No obstante, el empleo de estos agentes derivatizantes alternativos no ha supuesto la mejora deseada en los resultados obtenidos [39].

Sin embargo, a pesar del uso mayoritario de la derivatización para analizar los nitrofuranos y sus metabolitos, también se ha aplicado un procedimiento alternativo que prescinde de dicha etapa de derivatización y que analiza los nitrofuranos (compuestos padre) en piensos y agua, realizando la extracción mediante calentamiento con acetonitrilo [35].

Aparte de lo anteriormente mencionado, varios métodos publicados aplican un pretratamiento de la muestra basado en congelar y pulverizar el tejido muscular utilizando una licuadora hasta obtener un polvo fino [40]. Como etapa de pretratamiento, también se ha procedido a lavar la muestra con metanol y etanol frío [41], e incluso dietil éter [42].

En lo que respecta a la extracción, el método empleado más a menudo se basa en el uso de disolventes, y consiste en una extracción líquido-líquido (LLE), es decir, en una distribución o reparto de los analitos de la disolución procedente de la hidrólisis muestra entre dos disolventes inmiscibles donde el analito y la matriz presentan solubilidades diferentes. Experimentalmente, la muestra líquida se pone en contacto con un disolvente adecuado y tras un período de agitación, se separan las dos fases formadas. Durante este proceso, el analito se reparte entre ambos líquidos hasta alcanzar el equilibrio:

$$\text{Analito en la muestra } (A_m) \leftrightarrow \text{Analito en el disolvente } (A_d); \quad K = \frac{[A_d]}{[A_m]}$$

Cuanto mayor sea el valor de la constante de partición (K), más desplazado estará el equilibrio hacia la derecha y por tanto, mayor será la eficacia de la extracción.

No obstante, para el caso de muestras sólidas, hablamos de extracción sólido-líquido (SLE), que se basa, de forma análoga a la LLE, en la puesta en contacto de una cantidad determinada de muestra con un disolvente adecuado. Posteriormente, la mezcla es sometida a distintos procesos más o menos agresivos en función de la fortaleza de las interacciones analito-matriz, como son la agitación, la extracción Soxhlet, la extracción con fluidos supercríticos, extracción por microondas o la extracción acelerada [43].

Generalmente, para la LLE y la SLE se seleccionan aquellos disolventes orgánicos que posean una elevada afinidad por los analitos a separar, que sean totalmente inmiscibles con la fase acuosa (en el caso de la LLE) y que sean relativamente volátiles, para así facilitar una posterior eliminación por evaporación con el fin de preconcentrar el analito [43]. Generalmente, la extracción de los metabolitos derivatizados, ya sea

mediante LLE o SLE, se lleva a cabo utilizando un disolvente orgánico moderadamente polar, tal como acetato de etilo o acetonitrilo, y cuando es necesario, se aplica una etapa de limpieza con extracción en fase sólida (SPE) o LLE antes del análisis cromatográfico [3, 9, 11, 24]. Este tipo de procedimiento experimental ha sido asiduamente aplicado para el análisis de metabolitos de nitrofuranos en una gran variedad de matrices: piensos [44], huevos [45], miel [46], carne [10, 38, 47-49], leche [50, 51], retina [52] y productos procedentes de la acuicultura, como gambas [48], pescado [53], o cangrejo [54]. Otros estudios aplican varias LLE con acetato de etilo para garantizar la extracción de la máxima cantidad de residuo del tejido [55].

Sin embargo, aunque la extracción con disolvente es efectiva, la principal desventaja de las técnicas de LLE y SLE es que requieren el uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos, lo que condiciona su elevado coste. Además, aparte de ser una técnica difícil de automatizar, durante la aplicación de la LLE es frecuente la formación de emulsiones con las fases acuosas que son difíciles de extraer.

Todas estas dificultades, no obstante, pueden evitarse aplicando la SPE, una técnica alternativa que supone un menor consumo de disolvente [25, 37, 39] y que es de fácil automatización, a pesar de que también requiere tiempo y es necesario realizar un pre-acondicionamiento de los cartuchos. Esta técnica se basa en la diferente afinidad que presenta el analito (o la matriz) por una fase sólida (sorbente) o por la propia muestra líquida. Así, al pasar la muestra a través de la fase sólida, colocada en un cartucho de vidrio o polietileno y previamente acondicionada con un disolvente de propiedades similares a la muestra, algunos compuestos quedarán retenidos en ella mientras que otros pasarán inalterados. Posteriormente, si los analitos de interés han quedado retenidos, éstos podrán ser eluidos con un pequeño volumen de disolvente después de una etapa de lavado para eliminar posibles compuestos interferentes.

Las diferentes etapas descritas de la SPE aparecen esquematizadas en la Figura 5, mostrada a continuación:

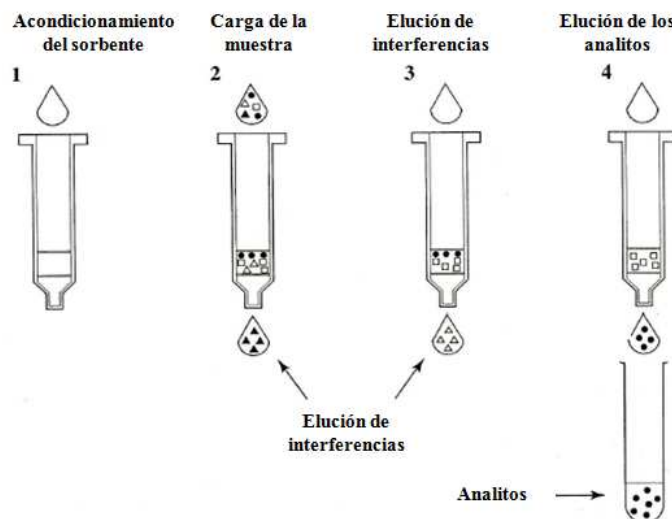


Figura 5. Esquema de las etapas de la extracción por SPE.

En consecuencia, la elección del sorbente a utilizar se llevará a cabo en función del analito, de su nivel de concentración y del disolvente en que se encuentre. La SPE es, por tanto, un método de preparación de la muestra cuyos principales objetivos son el enriquecimiento de trazas (concentración de los analitos y reducción del volumen de disolvente en el que finalmente se obtienen), y la purificación de los analitos contenidos en una disolución aislándolos de los compuestos interferentes (limpieza de la muestra y la consecuente simplificación de la matriz) [42]. Así pues, en diversas matrices alimentarias, tras hidrólisis y/o derivatización, por ejemplo carne [39, 56], se han aplicado métodos de extracción por SPE en lugar de LLE. Se ha descrito además, la aplicación de una elución secuencial en cartuchos de SPE OASIS con el objetivo de obtener los compuestos padre y los metabolitos de forma separada para su análisis aislado [57]. Adicionalmente, se han llevado a cabo dos etapas de SPE usando cartuchos de OASIS MAX y HLB para analizar nitrofuranos en tejido, con el propósito de eliminar el exceso de 2-NBA que pueda quedar sin reaccionar en la muestra [37]. Sin embargo, en determinados estudios experimentales se ha observado que la sustitución de la LLE o la SLE (en el caso de muestras sólidas) por la SPE, puede conducir a la obtención de bajas recuperaciones [46].

A continuación, tal como se mencionó anteriormente, una vez efectuada la extracción de la muestra es frecuente aplicar una etapa de limpieza al extracto líquido resultante, previamente al análisis cromatográfico, ya sea mediante SPE o LLE. En el caso de aplicarse la SPE, habitualmente se emplean cartuchos poliméricos [46] y de NH₂ [44].

Sin embargo, cuando se lleva a cabo mediante LLE, suele añadirse *n*-hexano como disolvente en el extracto final. El objetivo principal por el cual se aplica esta etapa adicional de limpieza es eliminar el material lipídico que pueda quedar presente después de la extracción de la muestra y puede ser de utilidad aplicarla, por ejemplo, en matrices tales como carne [47, 48], huevos [58] y pescado [48, 53].

Por último, con fines cuantitativos para posterior análisis cromatográfico, se han utilizado metabolitos de los nitrofuranos deuterados preferentemente con estándar interno (por ejemplo, D³-1-aminohidantoin, D⁴-3-amino-2-oxazolidinona y D⁵-3-amino-5-morfolinometil-2-oxazolidinona) [25]. Cabe citar que el método de cuantificación basado en el uso de estándar o patrón interno (IS) consiste en la adición de una cantidad constante y medida exactamente de un compuesto puro (IS) a un volumen de muestra que se desea cuantificar [59]. Los patrones de calibración deben contener también el IS. Se registran los cromatogramas tanto de los patrones como de la muestra, y se construye la curva de calibración a partir de la relación área patrón/área IS. Sin embargo, en el análisis de nitrofuranos, se han registrado algunos problemas relacionados con el uso de compuestos marcados isotópicamente no derivatizados (por ejemplo, pérdidas cuando se fortifican las muestras o sobreestimación del nivel de metabolitos enlazados). Por esta razón, una solución adecuada para cuantificar la liberación de los metabolitos es la adición de metabolitos de nitrofuranos marcados isotópicamente ya derivatizados (NBA-*d*₄-metabolitos derivatizados) [44, 46]. También ha sido descrita la adición de 4-NBA semicarbazona después de la etapa de derivatización como IS [56].

2.3.2. Técnicas para la determinación de nitrofuranos

Debido a que la legislación establece una estricta “tolerancia cero” respecto a la presencia de nitrofuranos en productos alimenticios, la monitorización de los residuos de los nitrofuranos requiere del uso de técnicas analíticas avanzadas, que se reduce en la mayoría de los casos a la cromatografía de gases (GC) o la cromatografía de líquidos (LC) acopladas a la espectrometría de masas (MS).

Conviene recordar que la cromatografía es un método de separación física en la que los componentes separados se distribuyen selectivamente en dos fases inmiscibles, una fase móvil que fluye a través de un lecho de fase estacionaria [60]. Por tanto, el proceso

de separación es un proceso dinámico que ocurre debido a las diferencias de constantes de distribución de los componentes individuales de la muestra entre esas dos fases.

La LC, técnica cromatográfica en la que una fase móvil líquida fluye a través de una fase estacionaria sólida o líquida contenida en una columna, es una de las herramientas más poderosas en Química Analítica para el análisis de un amplio rango de compuestos orgánicos a nivel de trazas [24]. La LC ha sido, pues, aplicada con éxito para el análisis de residuos de medicamentos veterinarios y agentes promotores del crecimiento en una extensa variedad de matrices [24]. En general, esta técnica se emplea para la determinación directa de compuestos polares, como la mayoría de los residuos veterinarios, y también para compuestos de menor polaridad pero que han sido sometidos a un proceso de derivatización adecuado.

En lo que respecta a la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), la fase móvil es un líquido sometido a altas presiones (superiores a 200 bar) para garantizar una velocidad de flujo constante, mientras que la fase estacionaria, con un tamaño de partícula menor que en la LC clásica, se encuentra relleno en una columna capaz de soportar las altas presiones que son necesarias [61]. Básicamente, un LC consiste en un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, una bomba de alta presión, un sistema de introducción de la muestra (inyector), la columna cromatográfica y, a continuación, el acoplamiento de un sistema de detección y de un sistema de adquisición y tratamiento de datos que permita “visualizar” la separación [62] (Figura 6).

Por otro lado, en HPLC, los analitos deben ser solubles en la fase móvil utilizada, llevándose a cabo la mayoría de las separaciones en fase reversa, en la que la fase móvil es más polar que la fase estacionaria (grupos C8 o C18). En estos sistemas, los analitos más polares eluyen más rápidamente que los menos polares. Cuando la separación cromatográfica se lleva a cabo utilizando una composición de fase móvil constante, el modo de trabajo se denomina elución isocrática, mientras que si la composición de la fase móvil varía con el tiempo, se conoce como elución en gradiente.

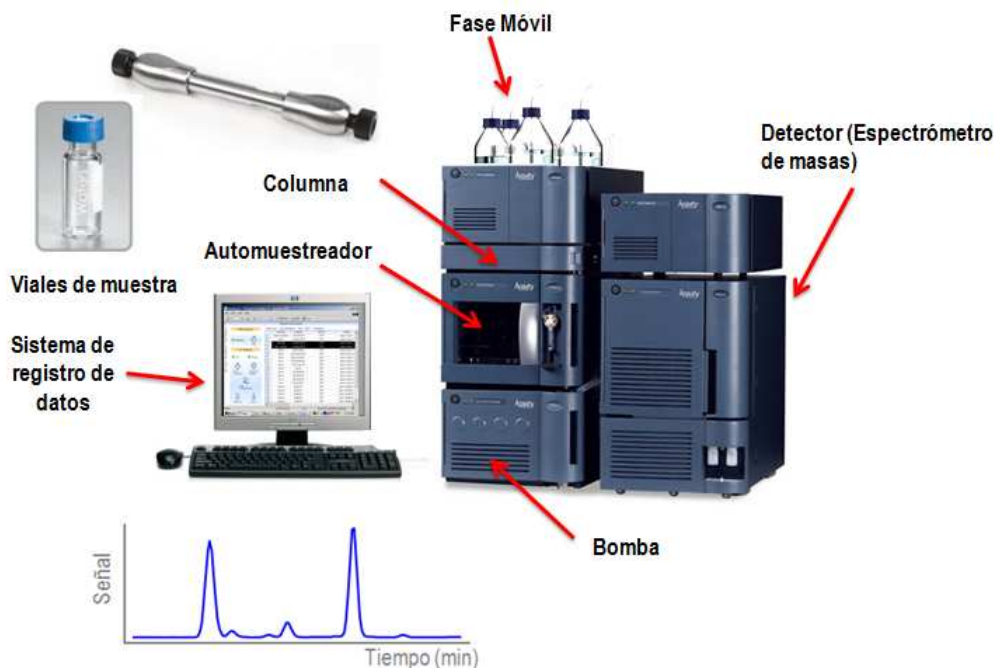


Figura 6. Instrumentación básica de un cromatógrafo de líquidos de ultra alta presión (UHPLC).

La eficiencia de separación, por su parte, está relacionada con el tamaño de partícula del material de relleno que constituye la fase estacionaria, necesitándose una mayor presión de trabajo cuanto menor sea dicho tamaño de partícula. Las columnas más utilizadas son aquellas que contienen una fase estacionaria con sílice químicamente modificada (condicionando así la polaridad de la columna), como por ejemplo la fase estacionaria constituida por el grupo alquilo C18 enlazado a la superficie de la sílice, que es ampliamente utilizada [63].

Las separaciones de medicamentos veterinarios normalmente se efectúan utilizando columnas de C18 (fase reversa) con una amplia variedad de fases móviles, dependiendo del sistema de detección empleado. Con MS se utilizan normalmente mezclas de agua-metanol y acetonitrilo a diferentes pH, añadiéndose también acetato amónico, formiato amónico y ácido fórmico para mejorar en este caso, la ionización. La selección de la fase móvil más apropiada es fundamental para obtener tiempos de retención reproducibles, picos con una forma adecuada, una buena sensibilidad y en el caso de utilizarse MS, buenas eficiencias de ionización [64].

En las referencias bibliográficas consultadas sobre el análisis de metabolitos de nitrofuranos, utilizándose columnas cromatográficas de C18, las fases móviles

empleadas han sido mezclas de agua:ácido acético (fase acuosa, FA) y acetonitrilo:agua:ácido acético (fase orgánica, FO) [10, 49]; acetato amónico 10 mM (FA) y metanol:agua (50:50, v/v) (FO) [39]; agua:ácido acético (FA) y acetonitrilo (FO) [46, 47]; ácido acético (FA) y acetonitrilo (FO) [55]; formiato amónico 10 mM (9:1, v/v) (FA) y metanol (FO); o acetato amónico (FA) y metanol (FO) [53]. A pesar de que las columnas de C18 son las más asiduamente empleadas, también aparece registrado en bibliografía el uso de columnas de C8, empleándose como fases móviles mezclas de agua (FA) y acetonitrilo (FO) [56] o formiato amónico (FA) y metanol (FO) [38]. Adicionalmente, las columnas monolíticas también han sido utilizadas como alternativa para acortar el tiempo de análisis y reducir el consumo de disolventes [35].

No obstante, la modalidad más destacada en LC es la cromatografía de líquidos de ultra alta presión (UHPLC), basada en el empleo de columnas con una tamaño de partícula inferior ($< 2 \mu\text{m}$) al de las columnas ordinarias (3-10 μm), que trabajan a altas presiones (6000-15000 psi) y que precisan de un sistema de bombas capaz de trabajar en dicho rango de presiones (Figura 6). La aplicación de la UHPLC en el análisis medicamentos veterinarios ofrece diversas ventajas: reducción del tiempo necesario para la separación cromatográfica (intervalos de tiempo generalmente inferiores a 10-15 minutos) y disminución de la anchura de pico. Así pues, el acoplamiento de la UHPLC a la MS puede ampliar las posibilidades que ofrece esta tecnología y promover el desarrollo de métodos analíticos rápidos [24].

2.3.2.1. Técnicas de detección

Los primeros métodos aplicados a la determinación de nitrofuranos utilizaban la LC con detección ultravioleta (UV) [42, 65] y la detección de diodos en fila (DAD) [10, 58, 66]. En general, a la hora de utilizar una detección clásica, DAD es preferible a UV. Puesto que el 2-NBA es frecuentemente empleado como agente derivatizante, se ha encontrado que los restos de este reactivo que quedan sin reaccionar pueden interferir considerablemente en la determinación por LC-UV de algunos metabolitos de los nitrofuranos [37]. Además, algunos análisis realizados para el control de nitrofuranos en piensos utilizando LC-UV han demostrado que el empleo de este método de detección no es completamente eficaz para procedimientos de *screening* y confirmación de varios nitrofuranos de forma simultánea [10].

No obstante, el empleo de la MS como técnica de detección es la opción más acertada a fin de obtener una identificación y una confirmación inequívocas de estos residuos. La MS es una técnica analítica que consta de una primera etapa de producción de iones (en estado gaseoso) a partir de moléculas o átomos de analito (ionización), involucrando dicho proceso la pérdida o ganancia de electrones o protones y pudiéndose invertir el exceso de energía transferida en la ruptura de la molécula en fragmentos característicos. Posteriormente, los iones son separados en base a su relación masa-carga (m/z) en el analizador, y finalmente, en el detector se mide, amplifica y se registra la corriente iónica generada [67]. El espectro de masas resultante es una representación de la abundancia (relativa) de los iones generados frente a la relación m/z [68].

El acoplamiento de un espectrómetro de masas como detector de HPLC resulta en una técnica híbrida (LC-MS) capaz de aportar gran cantidad de información estructural y el peso molecular del analito. Los tipos de ionización que pueden ser utilizados en LC-MS incluyen la ionización por electronebulización o electrospray (ESI) e ionización química a presión atmosférica (APCI) [69].

En APCI, el efluente procedente del LC pasa a través de un nebulizador neumático donde se produce la generación de pequeñas gotas y la posterior desolvatación de éstas. El spray así formado, pasa entonces a una región calefactora donde el vapor se seca, y las especies neutras producidas atraviesan una corona de descarga donde tiene lugar la ionización de los analitos, actuando el disolvente vaporizado como gas reactivo [70]. En términos generales, la ionización por APCI es aplicable a moléculas de baja polaridad y térmicamente estables.

Por el contrario, la ionización por ESI, consiste en la formación de un fino spray de gotas altamente cargadas bajo la influencia de un intenso campo eléctrico. La evaporación del disolvente, transforma esas gotas cargadas en iones en fase gaseosa [71]. Por tanto, cuando la LC-MS trabaja con ionización por ESI, la columna está conectada a un capilar cuya salida está sometida a un campo eléctrico elevado que produce la formación de pequeñas gotas altamente cargadas en una cámara a presión atmosférica. Cabe citar, además, que la ionización puede llevarse a cabo en modo negativo (formación de iones negativos) y positivo (formación de iones positivos). De forma genérica, la ionización por ESI resulta adecuada para el análisis de moléculas muy polares y de alto peso molecular. [72]

Aunque tanto los espectrómetros de masas basados en la técnica de trampa de iones como los dotados de analizador de triple cuadrupolo (QqQ) son válidos, este último es

mayoritariamente empleado para la cuantificación de niveles de ultra trazas en matrices complejas. Estos instrumentos se caracterizan por extensos rangos lineales para cuantificar, bajos límites de detección y buena reproducibilidad [25]. Conviene recordar que los analizadores de cuadrupolo están constituidos por cuatro barras metálicas de sección circular o hiperbólica, que deben ser perfectamente paralelas entre sí. Este dispositivo permite separar los iones en base a su relación m/z utilizando la estabilidad de las trayectorias a lo largo de las barras del cuadrupolo al aplicar campos eléctricos oscilantes. Puesto que la trayectoria es única para un determinado valor de m/z , sólo se permite el paso de aquellos iones con la relación m/z que haya sido fijada en el analizador [73]. El analizador de QqQ (Figura 7) consiste en tres conjuntos de barras de cuadrupolo en serie donde el primer y tercer cuadrupolo actúan realmente como analizadores de masas (Q), mientras que el segundo cuadrupolo (q) se emplea como una celda de colisión (CID) [74]. Este analizador QqQ permite la realización de procesos de MS en tándem (MS/MS), modo de trabajo que implica llevar a cabo dos procesos de MS consecutivos (MS^2): en el Q1 se someten a análisis los iones generados en la fuente de ionización y en el Q3 se analizan las masas de los iones generados en la CID [73].

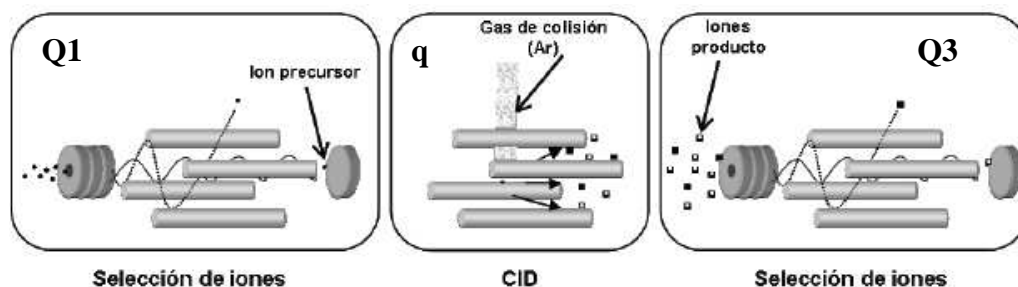


Figura 7. Esquema genérico del funcionamiento de un analizador QqQ.

Aplicando la MS/MS, el empleo de los analizadores QqQ permite cuatro modos de trabajo: barrido de iones producto, barrido de iones precursores, barrido de pérdida de neutros y monitorización de reacciones seleccionadas (SRM o MRM). En la Figura 8, mostrada a continuación, aparece esquematizado el funcionamiento de cada uno de estos modos de trabajo:

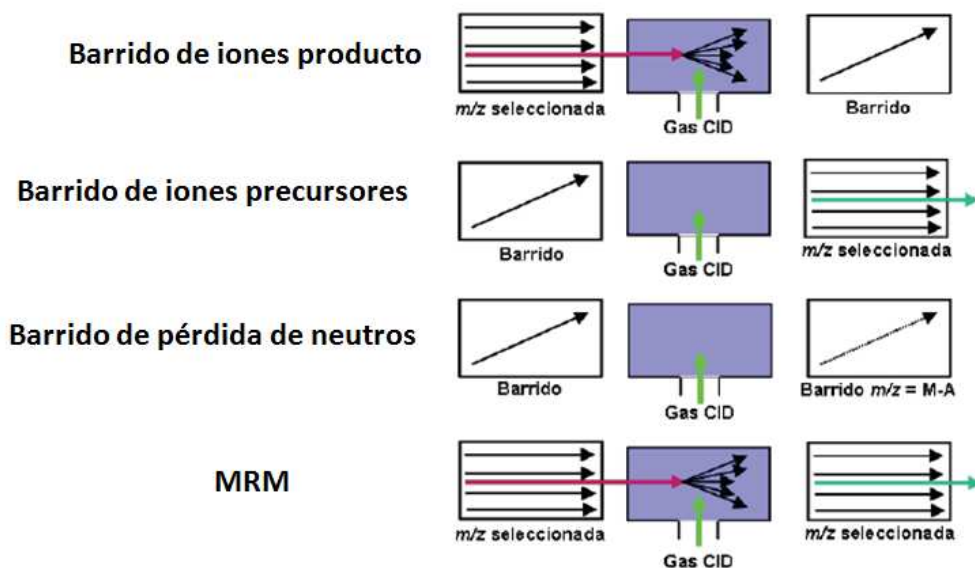


Figura 8. Diferentes modos de trabajo en MS/MS.

Frente a la necesidad de obtener resultados cuantitativos a niveles de concentración de ppb (μg de metabolito por kg de tejido) en matrices de gran complejidad y la consecuente necesidad de técnicas analíticas potentes capaces de garantizar el cumplimiento de este requisito, la detección con MS/MS surge como la opción más fiable para garantizar una alta seguridad en los resultados [25]. Así pues, se han realizado estudios comparativos entre el empleo de la LC-MS y el empleo de LC-MS/MS, obteniéndose una mayor selectividad en el análisis de los nitrofuranos con LC-MS/MS [57].

La mayor sensibilidad en MS para los cuatro metabolitos de los nitrofuranos ha sido obtenida usando el modo de ionización ESI positivo (ESI +), en lugar de APCI [39,75]. Las regulaciones europeas [76] requieren, además, la aplicación de la monitorización de reacciones múltiples (MRM), basada en el empleo de un ion precursor y dos iones producto para la identificación inequívoca de los analitos, evitándose así la obtención de falsos positivos en los resultados, aumentándose la sensibilidad y la selectividad con respecto a otros modos de trabajo. En todos los casos, el ion precursor $[M+H]^+$ es el más abundante [25, 53].

Por tanto, el acoplamiento de la LC con ionización por ESI a la MS/MS (HPLC-MS/MS y LC-ESI MS/MS, respectivamente) ha incrementado significativamente la capacidad de los métodos de cuantificación para la determinación de nitrofuranos en los últimos años [38, 39, 42, 44, 47, 49, 54-56, 75].

Un problema asociado particularmente a la determinación de los metabolitos de los nitrofuranos enlazados al tejido, es su ya mencionada baja masa molecular. Por esta razón, estos metabolitos aparecen incluidos en el rango típico del ruido de fondo del espectrómetro de masas, presentan una baja eficiencia de ionización y un comportamiento de fragmentación no específico (predominantemente pérdida de amoníaco, agua o dióxido de carbono), ocasionando todo ello una detección por espectrometría de masas relativamente baja. Adicionalmente, las propiedades cromatográficas de estos compuestos comparativamente polares en las columnas de fase reversa son desfavorables, obteniéndose poca retención. Por todo lo enumerado anteriormente, es muy recomendable llevar a cabo la derivatización química de los metabolitos a fin de obtener compuestos con propiedades más favorables [39]. Así, aplicando esta etapa de derivatización, las masas moleculares son incrementadas sustancialmente, localizándose los iones precursores en el rango de 209-335 Da y minimizándose así la influencia del ruido de fondo del espectrómetro de masas. La selectividad del método se ve además, aumentada notablemente, pues la hidrofobicidad del agente derivatizante contribuye a fortalecer la retención de los analitos en columnas de fase reversa, lo que permite una mejor separación de las moléculas de analito derivatizadas de las matrices complejas [25].

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos y materiales

Tanto los patrones analíticos AOA, AMOA, SEM-HCl y AHD-HCl, como el agente derivatizante, 2-NBA, se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid, España). En todos los casos, la pureza fue igual o superior al 99%.

La preparación de las disoluciones patrón individuales (disoluciones madre) de cada uno de los compuestos se llevaron a cabo por pesada exacta de los sólidos y su posterior disolución en 50 mL de metanol (J.T. Baker, Deventer, Holanda, grado HPLC). Se prepararon concentraciones en el rango de 250-374 mg/L, y se almacenaron a -20°C en la oscuridad, siendo estables, según lo consultado en bibliografía, durante al menos 6 meses [10, 38]. A partir de estas disoluciones madre, se preparó una disolución intermedia de 2 mg/L que contenía a todos los metabolitos, y que se almacenó en las mismas condiciones.

Por otro lado, el acetonitrilo (ACN) de grado HPLC, acetato de etilo (99.7%) y *n*-hexano (97%) fueron también obtenidos de Sigma-Aldrich (Madrid, España), mientras que el sulfato magnésico anhidro (97%) y el hidrógeno fosfato de di-sodio (99%) fueron proporcionados por Panreac (Barcelona, España) y el ciclohexano, por Scharlau (Barcelona, España). El formiato amónico (99%) y el ácido fórmico (~98%) fueron suministrados por Fluka (Buchs, Suiza). El C18-Bondesil utilizado en la etapa de limpieza fue administrado por Varian (Palo Alto, CA, EEUU), y el citrato trisódico (99%), cloruro sódico (99.5%), sulfato sódico anhidro (99%), acetato sódico (99%), ácido clorhídrico (HCl, 37%), hidróxido sódico (NaOH, 97%) y Florisil fueron obtenidos de J.T. Baker.

El agua ultrapura utilizada en la preparación de todas las disoluciones acuosas empleadas y de la fase móvil, se obtuvo de un sistema de gradiente de agua Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EEUU).

En lo que respecta a la SPE, se utilizaron cartuchos de extracción de OASIS HLB (200 mg/6 cm³) y cartuchos de C18 Sep-Pak Vac (500 mg/6 cm³), ambos suministrados por Waters (Milford, MA, EEUU).

Además, para la extracción se utilizaron tubos de polipropileno de 50 mL y microtubos de 2 mL, empleándose también filtros de jeringa de 0.22 µm de nylon

proporcionados por Millipore (Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) para el filtrado de los extractos de las muestras.

3.2. Instrumentos y aparatos

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en un sistema Acquity UHPLC (Waters, Milford, MA, EEUU), utilizándose una columna Kinetex C18 (50 mm x 2.1 mm, con un tamaño partícula de 2.6 μm), procedente de Phenomenex (Torrance, CA, USA). El análisis por MS se realizó en un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (TQD) Acquity, suministrado por Waters (Manchester, Reino Unido), operando en ESI+. Los parámetros de ESI utilizados aparecen enumerados en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de los principales parámetros utilizados en la fuente ESI+.

Voltaje del capilar	3.5 kV
Voltaje del extractor	2 V
Temperatura de la fuente	120°C
Temperatura de desolvatación	350°C
Flujo gas de cono (N₂)	80 L/h
Flujo gas de desolvatación (N₂)	600 L/h

En lo referente a la disociación inducida por colisión, ésta se llevó a cabo utilizando argón como gas de colisión a la presión de 3.3×10^{-3} mbar, en la celda de colisión.

Por otro lado, se utilizaron el software MassLynx (versión 4.0) y el QuanLynx (Waters) para adquirir y procesar los datos, respectivamente.

Para agitar las muestras durante la extracción se empleó un agitador rotatorio Heidolph, modelo Reax-2 (Schwabach, Alemania), mientras que para centrifugar se utilizó una centrífuga Centronic BL II (J. P. Selecta, Barcelona, España). La SPE se llevó a cabo en un sistema de SPE de Waters (Milford, MA, USA) y para la evaporación y concentración de la muestra se empleó un evaporador Syncore de Büchi (Flawil, Suiza).

3.3. Procedimiento de extracción

Se pesaron 2.5 g de gamba en tubos de polipropileno de 50 mL y se añadieron 10 mL de una disolución de HCl (0.2 M) para llevar a cabo la hidrólisis y 100 μL de una disolución de 2-NBA (0.1 M en MeOH), recién preparada, para derivatizar. Se agitaron

los tubos para homogeneizar la mezcla y las muestras se dejaron derivatizando durante toda la noche en un baño de agua ($T \approx 37^{\circ}\text{C}$). Al día siguiente, después de dejar enfriar hasta temperatura ambiente, se neutralizó la mezcla, añadiéndose para ello hidrógeno fosfato de di-sodio (0.1 M, 1.5 mL) y NaOH (2.5 M, 0.2 mL). Acto seguido, las muestras se agitaron durante unos 15 s y se centrifugaron 5 minutos a 4000 rpm. A continuación, se procedió a llevar a cabo un proceso de SPE utilizando cartuchos OASIS HLB. Para ello, en primer lugar, se acondicionaron los cartuchos añadiendo acetato de etilo (5 mL), metanol (5 mL) y agua (5 mL). Una vez acondicionados, se cargaron las muestras, y una vez eluidas éstas, se procedió a lavar los cartuchos, para eliminar posibles interferencias, haciendo pasar primero agua Milli-Q (5 mL) y después metanol al 30% en agua Milli-Q (5 mL). Finalmente, tras secar a vacío los cartuchos durante 5 minutos, se eluyeron los analitos retenidos con acetato de etilo (6 mL), evaporándose hasta sequedad los extractos recogidos, utilizando para ello una corriente de N_2 a temperatura ambiente.

Por último, se reconstituyeron las muestras en 1 mL de fase móvil (formiato amónico 10 mM/ MeOH, 50:50), se filtraron, y se pasaron a viales para su posterior inyección (5 μL) en el sistema cromatográfico.

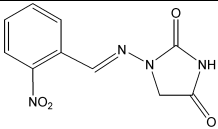
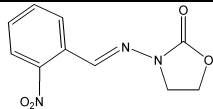
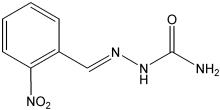
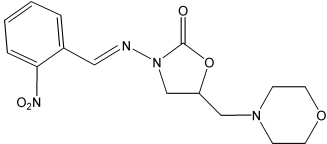
3.4. Análisis mediante UHPLC-QqQ-MS/MS

Para llevar a cabo el análisis cromatográfico, utilizando una fase móvil constituida por MeOH (eluyente A) y formiato amónico 10mM (eluyente B), se aplicó una elución en modo gradiente que comenzaba con un 20% del eluyente A y que se incrementó al 100% en 3.5 minutos. Esta composición se mantuvo durante 1 minuto y finalmente se llevó a cabo un re-equilibrado de 1.5 min para volver a las condiciones iniciales del gradiente de elución, obteniéndose un tiempo total de análisis, para cada muestra, de 5.50 min.

El flujo de fase móvil fue de 0.3 mL/min, utilizándose un volumen de inyección de 5 μL , y fijándose una temperatura de 30°C en la columna C18 utilizada (fase reversa).

La detección de los analitos se realizó utilizando el QqQ en el modo de adquisición de monitorización de reacciones múltiples (MRM), monitorizando dos transiciones para cada ion precursor. Los iones seleccionados y otros parámetros óptimos se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2. Ventanas de tiempo de retención (VTR) y principales parámetros MS/MS de los compuestos analizados.

Compuesto	VTR (min)	Segmento	Ion precursor, <i>m/z</i>	Voltaje de cono (V)	Iones producto, <i>m/z</i> (Energía de colisión, eV)	Dwell time (s)
 NP-AHD; PM ^a = 248.1	1.87-2.03	1	249	35	134 (10), 104 (20)	0.05
 NP-AOZ; PM = 235.1	1.95-2.06	1	236	35	134 (10), 104 (20)	0.05
 NP-SEM; PM = 208.1	2.00-2.11	1	209	35	166 (10), 192 (10)	0.05
 NP-AMZ; PM = 334.2	2.26-2.37	2	335	35	291(10), 262 (15)	0.05

^aPM: Peso molecular (g/mol)

3.5. Muestras

La compra de gambas frescas se llevó a cabo en distintos supermercados locales de la provincia de Almería. Una vez adquiridas las muestras, éstas fueron trituradas en una picadora industrial, almacenándose el material homogeneizado en un congelador a -20°C hasta su análisis. Aquellas muestras que no mostraron presencia de los analitos de interés, se utilizaron como blancos en la preparación de los estándares de calibración y en muestras fortificadas, a fin de efectuar estudios de recuperación y la optimización y validación del método.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

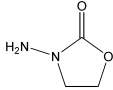
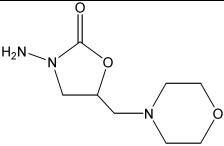
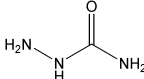
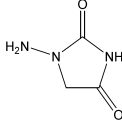
A fin de llevar cabo este trabajo, cuyo objetivo es la determinación de los metabolitos de los nitrofuranos en productos del mar, fue necesario optimizar un procedimiento adecuado de derivatización de los compuestos, caracterizarlos espectrométricamente y optimizar las condiciones cromatográficas. Además, fue preciso evaluar y optimizar el procedimiento de extracción y limpieza de las muestras, cuyo mayor inconveniente residió en la complejidad de la matriz y la necesidad de conseguir unos LOQs realmente bajos para los compuestos analizados.

4.1. Optimización de las condiciones espectrométricas y cromatográficas

4.1.1. Metabolitos de los nitrofuranos sin derivatizar

En primer lugar, se hizo la prueba de caracterizar espectrométricamente los metabolitos de los nitrofuranos sin derivatizar (AMTZ, AOZ, SEM y AHD), preparándose para ello una disolución de 25 mg/L de los cuatro compuestos en MeOH (volumen final 5 mL). Se adicionaron 25 µL de ácido fórmico para favorecer la ionización por ESI+ y se registró, en primer lugar, un espectro de barrido completo (*full scan*) para optimizar el voltaje de cono. Una vez seleccionado el voltaje de cono óptimo para el ion precursor más abundante, $[M+H]^+$, de cada metabolito, se evaluaron las energías de colisión y se seleccionaron dos transiciones para cada ion precursor. Los resultados obtenidos se registran en la Tabla 3. Una vez seleccionados estos parámetros espectrométricos, se inyectó un vial con una concentración de 500 µg/L de los cuatro metabolitos en el cromatógrafo, probando las siguientes condiciones cromatográficas recopiladas de varias referencias bibliográficas [10, 39, 54, 53, 56]: fase móvil compuesta por agua con ácido fórmico al 0.01% (v/v) (B) y MeOH (A), flujo de trabajo de 0.3 mL/min, una columna C18, temperatura de la columna de 30°C y un volumen de inyección de 5 µL.

Tabla 3. Condiciones MS/MS optimizadas para el análisis de los metabolitos de los nitrofuranos sin derivatizar.

Metabolito sin derivatizar	t_R^a (min)	Ion precursor, m/z	Voltaje de cono (V)	Iones producto, m/z (Energía de colisión, eV)
 AOX P.M. = 102.1	0.46	103	30	59 (25), 41 (30), 31 (30)
 AMOX P.M. = 201.2	0.39	202	30	129(15), 126 (20), 100(25)
 SEM P.M. = 75.1	0.41	76	25	59 (15), 44(15) 31(15)
 AHD P.M. = 115.1	-	117	20	59 (10), 41 (20), 31(25)

^a t_R : Tiempo de retención.^aPM: Peso molecular (g/mol)

El gradiente aplicado en estas condiciones implicaba un tiempo de análisis de 6 min y se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Gradiente utilizando para análisis de los nitrofuranos sin derivatizar

<i>Tiempo (min)</i>	<i>% MeOH (A)</i>	<i>% Ácido fórmico 0.01% (B)</i>
0	10	90
4	100	0
5	100	0
5.5	10	90
6	10	90

Tal como se observa en la Figura 9, los tiempos de retención (t_R) obtenidos fueron demasiado bajos, lo cual puede ocasionar problemas de selectividad al estar los picos cromatográficos ubicados en una zona de abundante ruido de fondo. Además, la intensidad observada de los picos fue, salvo en el caso de AMOZ, bastante baja, obteniéndose una baja sensibilidad. Para el AHD, ni siquiera era posible obtener una señal analítica correctamente. Por tanto, se llegó a la conclusión de que incluir la etapa de derivatización de los metabolitos de los nitrofuranos era imprescindible para obtener unos buenos resultados en la detección y posterior cuantificación de estos compuestos.

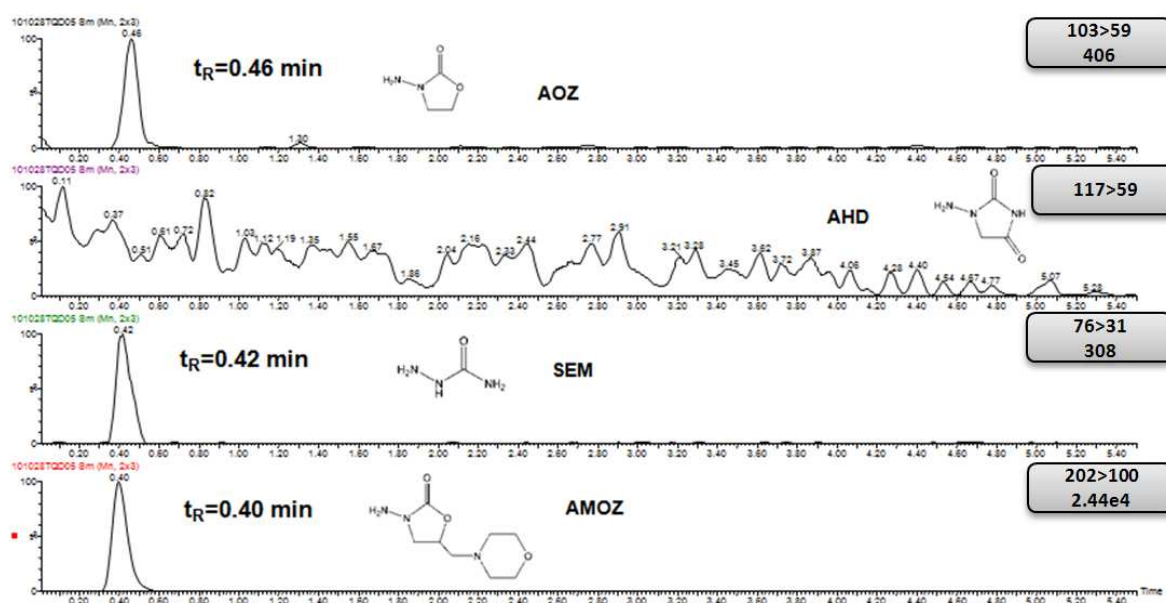


Figura 9. Cromatograma de los nitrofuranos no derivatizados.

4.1.2. Metabolitos de los nitrofuranos derivatizados

Como punto de partida, para la optimización de los parámetros del espectrómetro de masas (voltaje de cono y energía de colisión), fue necesario derivatizar los metabolitos de los nitrofuranos. Para ello, se preparó una disolución a 25 mg/L de los cuatro compuestos, se añadieron 200 μ L del agente derivatizante, 2-NBA (0.1 M, en MeOH), y se añadió MeOH hasta un volumen final de 4 mL. A continuación, la disolución se introdujo en un baño de agua a 37°C y se dejó derivatizando durante toda la noche. Al día siguiente, se perfundió la disolución con los compuestos derivatizados en el espectrómetro de masas con el objetivo de ajustar las distintas variables experimentales

para obtener la mejor sensibilidad. Como técnica de ionización, y atendiendo a las experiencias descritas en bibliografía, se seleccionó ESI+ (parámetros enumerados en la Tabla 2). Por tanto, a fin de mejorar la eficiencia de la ionización, se añadieron 25 μL de ácido fórmico. En primer lugar, con el propósito de seleccionar el ion más abundante, se procedió a adquirir un espectro de barrido completo, optimizando el voltaje de cono (V) y trabajando sólo con un cuadrupolo (en modo MS). En el caso de todos los metabolitos, los iones $[\text{M}+\text{H}]^+$ fueron los más abundantes, seleccionándose por ello, como iones precursores y fijándose para cada uno de ellos, el mínimo voltaje de cono que proporcionaba una señal constante y de mayor intensidad (Figura 10). A continuación, trabajando en modo MS/MS, se sometieron a estudio las energías de colisión, a fin de identificar los iones producto. Como criterios de selección, se procedió a escoger aquellos iones producto con mayor m/z (más selectividad) y mayor intensidad (mayor sensibilidad). Así pues, para cada ion precursor se seleccionaron dos transiciones, empleándose la más sensible con fines de cuantificación y la segunda de mayor abundancia, para confirmación (Tabla 2).

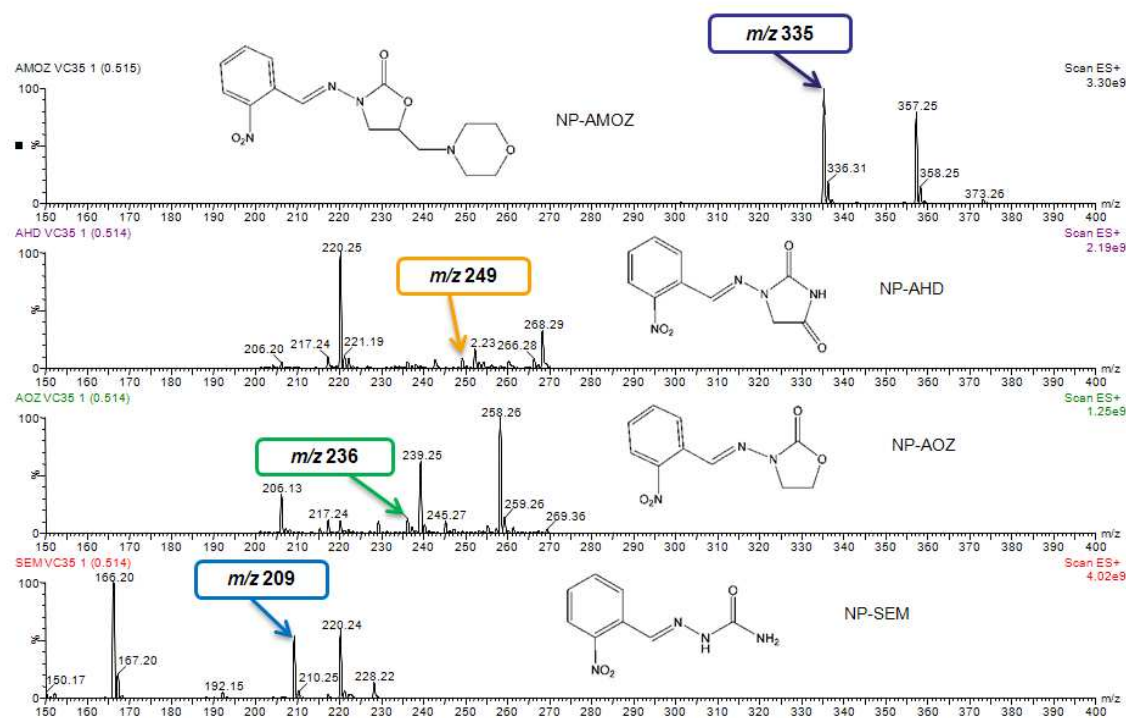


Figura 10. Espectro de barrido completo mostrando los iones precursores seleccionados a un voltaje de cono de 35V.

Puesto que NPAHD y NPAOZ poseen un ion producto común (m/z 104), se evaluó la resolución espectral al usar una transición de confirmación con el mismo ion para

ambos compuestos. Para ello, se inyectó un vial conteniendo NPAHD y otro vial conteniendo NPAOZ y se monitorizó cada metabolito con las transiciones seleccionadas para el otro. El resultado fue que no se obtuvo señal para ninguno de los dos monitorizándolos en las condiciones espectrométricas del otro, así que se confirmó que el empleo del ion de m/z 104 como ion producto era adecuado y no suponía una interferencia para la correcta determinación y cuantificación por separado de ambos analitos.

Por otro lado, para optimizar las condiciones cromatográficas, se llevaron a cabo una serie de experimentos previos en los que se evaluaron la composición de fase móvil, el volumen de inyección, el flujo de trabajo, la temperatura de la columna, el gradiente de elución y el *dwell time*.

En primer lugar, para el estudio de la fase móvil óptima, se preparó un vial de 500 $\mu\text{g/L}$ con los cuatro nitrofuranos derivatizados, tomando una alícuota de 200 μL de la disolución intermedia de 2 mg/L , añadiéndole 800 μL de 2-NBA y derivatizando toda la noche (baño de agua, 37°C). Todas las fases móviles evaluadas contaron con MeOH como eluyente A y con un eluyente B variable: con formiato amónico 5mM, acetato amónico 5mM, y agua con ácido fórmico al 0.1%, 0.05% y al 0.01% (v/v). Para llevar a cabo estas pruebas cromatográficas, se utilizó la elución por gradiente que se indica a continuación (Figura 11).

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
Initial	0.300	10.0	90.0
0.50	0.300	10.0	90.0
6.00	0.300	100.0	0.0
8.00	0.300	100.0	0.0
9.00	0.300	10.0	90.0
9.50	0.300	10.0	90.0

Figura 11. Gradiente 1.

Los resultados mostraron que la mayor sensibilidad se conseguía utilizando MeOH y formiato amónico (Figura 12), así que se hicieron pruebas con distintas concentraciones de éste último: 5 mM, 10 mM y 20 mM. También, se probó a preparar la fase orgánica con formiato amónico en MeOH inyectando un vial a 200 $\mu\text{g/L}$ en disolvente. Puesto que la mayor intensidad de los picos cromatográficos se consiguió utilizando MeOH (A) y formiato amónico 10 mM (B), se seleccionó esta última composición de la fase móvil para el resto de los experimentos.

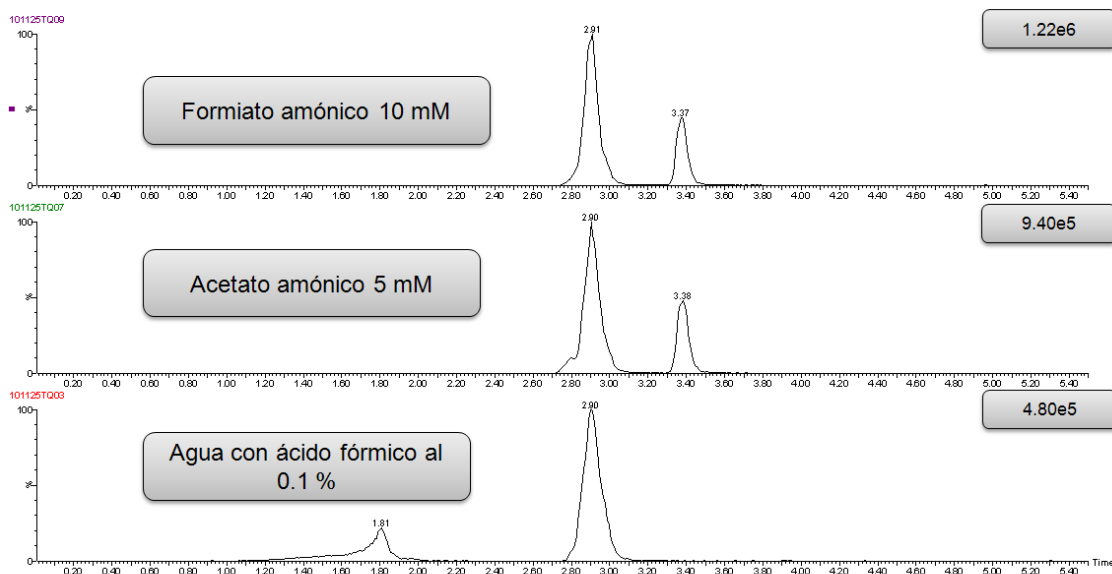


Figura 12. Cromatograma total de iones (TIC) de los analitos utilizando diferentes fases acuosa en la fase móvil.

Se sometieron a estudio, además, dos perfiles de gradiente diferentes, el Gradiente 1 (Figura 11) y el Gradiente 2 (Figura 13), seleccionándose como óptimo este último. En dicho gradiente, se reducía el tiempo de análisis y se aumentaba el poder de elución de la fase móvil al principio para mejorar la separación cromatográfica y adelantar los tiempos de retención.

Time (min)	Flow (mL/min)	%A	%B
Initial	0.300	20.0	80.0
0.50	0.300	20.0	80.0
3.50	0.300	100.0	0.0
4.50	0.300	100.0	0.0
5.00	0.300	20.0	80.0
5.50	0.300	20.0	80.0

Figura 13. Gradiente 2.

Con este nuevo gradiente (Gradiente 2) se evaluaron otros parámetros tales como la temperatura de la columna (30, 35 y 40°C), considerándose como óptimo inyectar a 30°C, pues permitía la obtención de picos cromatográficos más intensos. Con esta temperatura, se evaluó el flujo de fase móvil (0.2, 0.3 y 0.4 mL/min), seleccionándose

un flujo de 0.3 mL/min pues se obtenía un señal más intensa y una buena forma de pico (Figura 14).

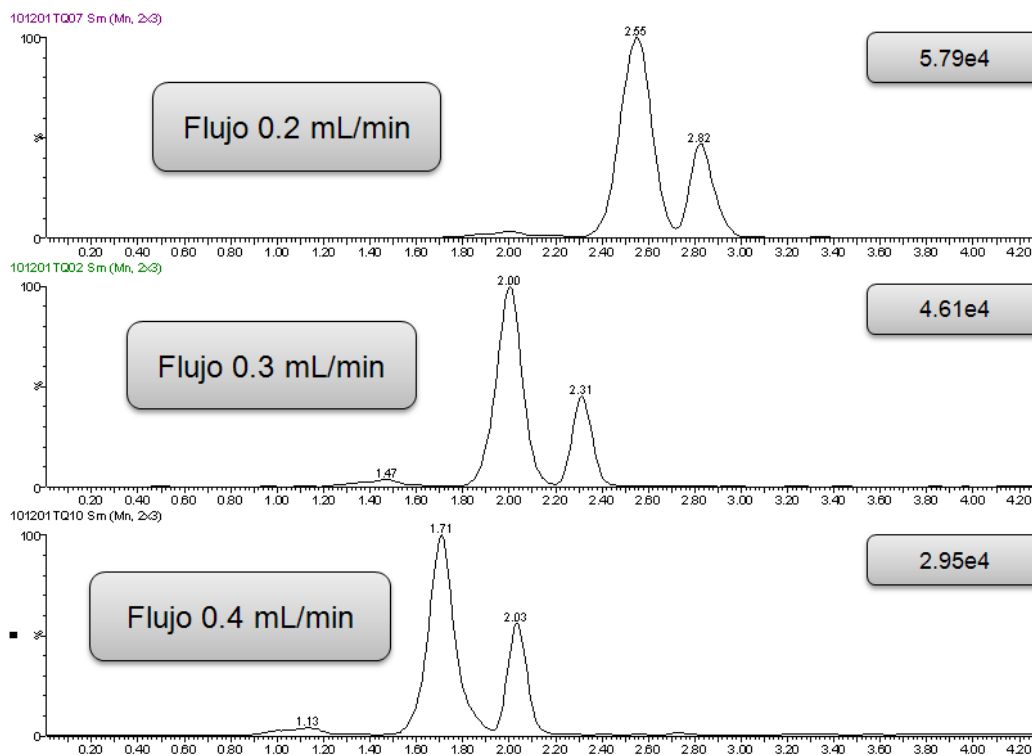


Figura 14. Cromatograma total de iones (TIC) de los analitos utilizando diferente flujo de fase móvil en la separación.

A continuación se sometió a prueba el *dwel time*, probándose valores de 5, 10, 15, 25, 50 y 100 ms (Figura 15). Los mejores resultados de detección y sensibilidad se consiguieron fijando un *dwel time* de 50 ms para cada una de las transiciones monitorizadas (Tabla 2).

Simultáneamente a las pruebas de extracción descritas en el siguiente apartado, se evaluó también el volumen de inyección (5 y 10 μ L), obteniéndose buenos resultados utilizando un volumen de 5 μ L y no existiendo, por tanto, necesidad de trabajar con un volumen mayor.

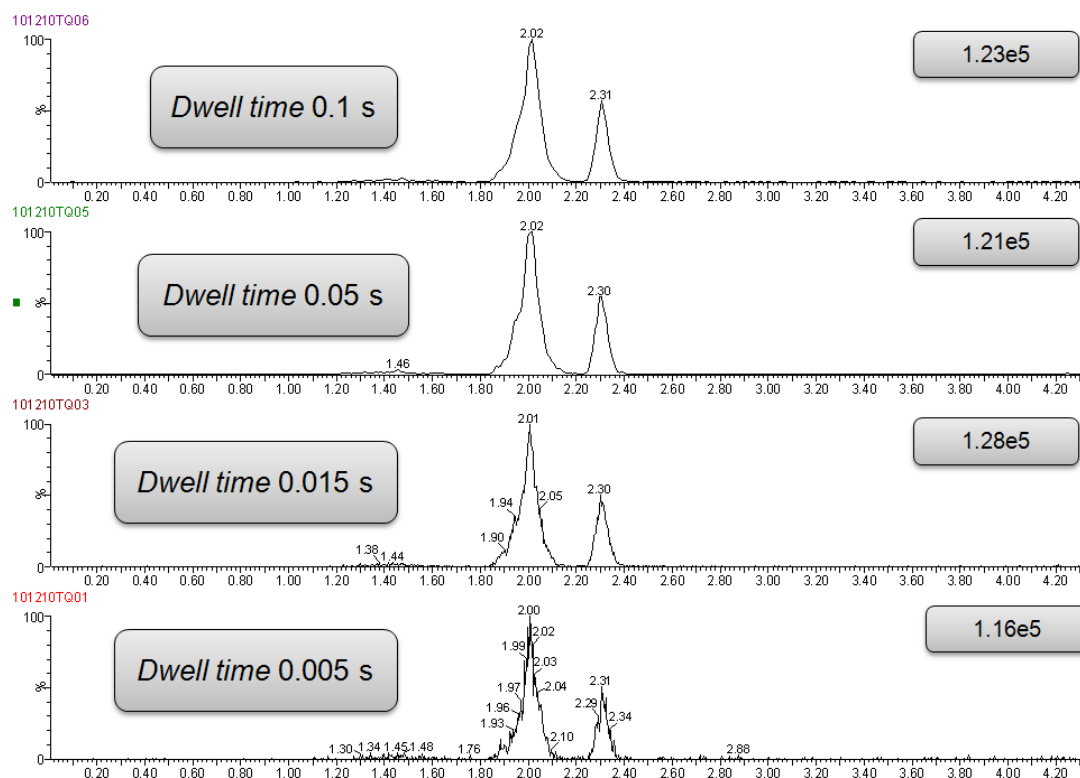


Figura 15. Cromatograma total de iones (TIC) de los analitos obtenidos al emplear diferentes valores de *dwell time*.

Finalmente, los compuestos se distribuyeron en dos segmentos en el método de MS, a fin de optimizar la separación y consiguiéndose una mejora de la sensibilidad. En el segmento 1 (0-2.25 min) se incluyeron NPAOZ, NPSEM y NPAHD, mientras que en el segmento 2 (2.15-5.50 min.) se adquirió únicamente NPAMOZ.

4.2. Optimización de la derivatización de los metabolitos de los nitrofuranos

Con el objetivo de optimizar el proceso de derivatización y reducir el tiempo de reacción, se preparó una disolución de 50 µg/L en disolvente (MeOH) y se añadieron 100 µL de 2-NBA, dejándose derivatizando durante 4 horas a 55°C en un baño de agua (Figura 16).

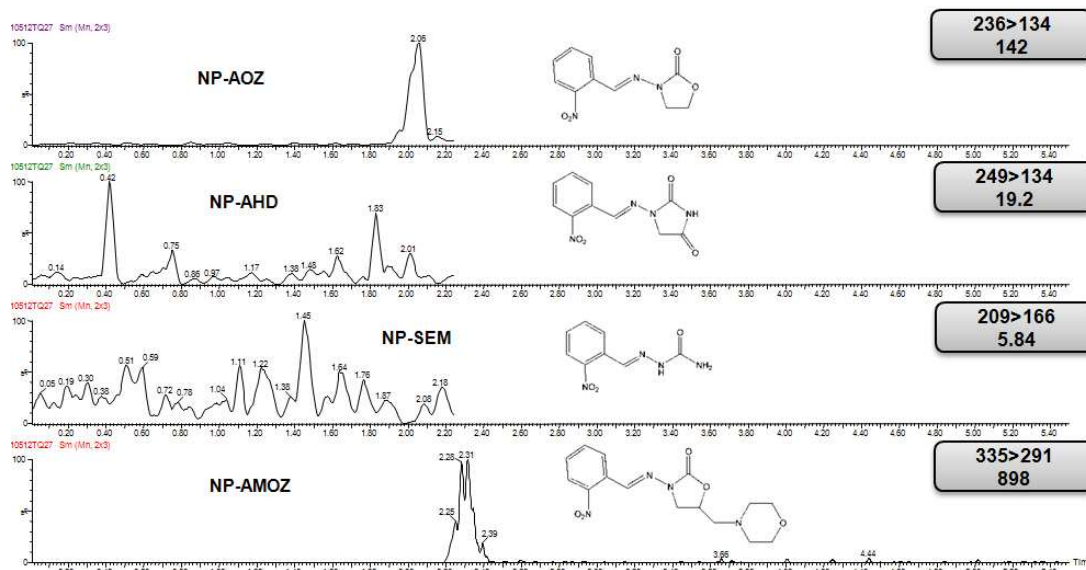


Figura 16. Cromatograma obtenido derivatizando los analitos a 55°C durante 4h.

A continuación, se compararon los resultados de esta prueba con los obtenidos derivatizando durante toda la noche a 37°C, con una disolución en disolvente a la misma concentración de los metabolitos (50 µg/L). Los resultados obtenidos de esta segunda experiencia aparecen reflejados en la Figura 17.

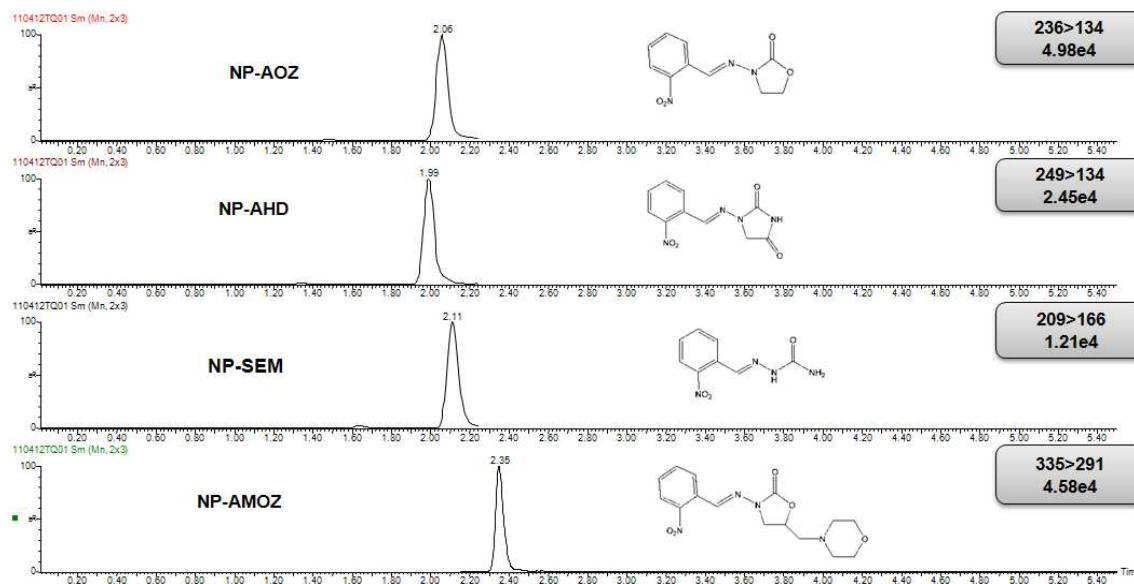


Figura 17. Cromatograma obtenido derivatizando los analitos a 37°C durante toda la noche.

Finalmente, se llegó a la conclusión de que las mejores condiciones para la derivatización se conseguían realizando la reacción de derivatización durante más tiempo (empleando toda la noche) y a 37°C.

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio de la estabilidad de los metabolitos de los nitrofuranos derivatizados, inyectando patrones derivatizados en matriz a 50 µg/kg, que fueron sometidos a tres condiciones de almacenamiento diferentes: temperatura ambiente, 5°C (cámara fría en la oscuridad) y -20°C (congelador en la oscuridad). Los resultados obtenidos indicaban que los compuestos derivatizados eran estables al menos durante una semana (Figura 18).

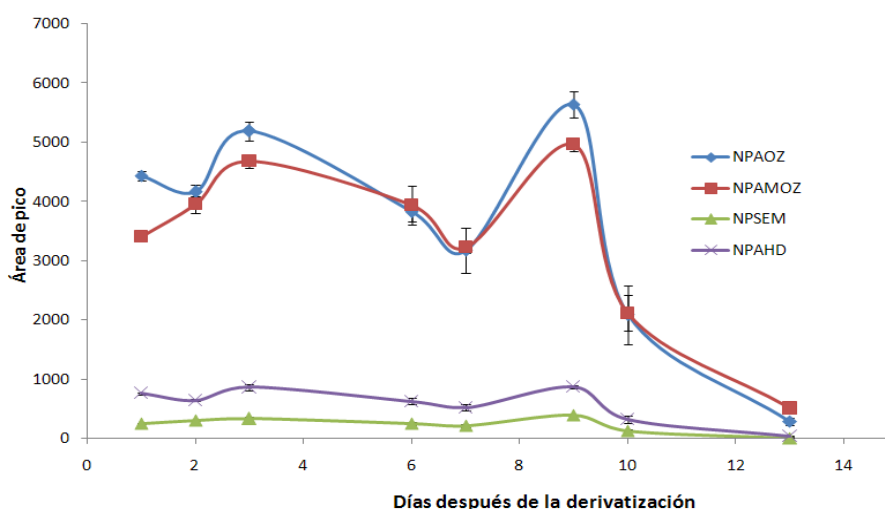


Figura 18. Gráfica de estabilidad obtenida para los nitrofuranos derivatizados almacenados a temperatura ambiente.

4.3. Optimización del procedimiento de extracción

Con el objetivo de optimizar la extracción de la muestra, se evaluaron diversos procedimientos alternativos, en los que se sometieron a análisis múltiples aspectos como la derivatización de las muestras, el tiempo de extracción, los disolventes de extracción utilizados, el uso de sales para favorecer dicha extracción, la dilución de las muestras, la cantidad de muestra y, finalmente, las etapas de preconcentración y limpieza de los extractos. Estos experimentos fueron llevados a cabo utilizando muestras fortificadas de gamba con un nivel de concentración de 100, 200 y 250 µg/kg.

Las referencias bibliográficas consultadas coincidían en la necesidad de llevar a cabo la hidrólisis de las muestras de forma previa a la extracción. En primer lugar, a fin de

reducir el tiempo de extracción, se realizaron las etapas de hidrólisis y extracción de forma simultánea en un solo paso, adicionando ACN (1% ácido fórmico) y agitando durante 1 h en el agitador rotatorio. A continuación, se añadió 2-NBA para derivatizar los metabolitos y se dejó reaccionando durante toda la noche en un baño de agua, manteniendo la temperatura alrededor de los 37°C. Aplicando este primer procedimiento, se obtuvieron recuperaciones relativamente buenas (comprendidas entre 102 y 118 %), aunque el compuesto NP-SEM, no fue detectado (Tabla 5) y las desviaciones estándar relativas (RSD) eran muy altas (> 15 %)

A fin de mejorar la sensibilidad y las recuperaciones, sin incrementar el tiempo de extracción, se aplicó una etapa de hidrólisis y derivatización simultáneas durante toda la noche, adicionando para ello agua acidificada (1% ácido fórmico) y 2-NBA. Después de la derivatización, la extracción se realizó añadiendo ACN (1% ácido fórmico) y agitando durante 1 h. En esta ocasión, si fue posible detectar NP-SEM, pero para el resto de los metabolitos derivatizados se obtuvieron valores bajos de recuperaciones, excepto en el caso de NP-AHD (Tabla 5), cuyo valor de recuperación excedía el 120%.

Con el propósito de mejorar el método de extracción, se evaluó la cantidad de muestra inicial (2, 4 y 5 g, respectivamente), aplicándose los dos métodos arriba descritos. En primer lugar, se aplicó la etapa de hidrólisis, adicionando agua (1% ácido fórmico) y agitando durante 15 min para favorecer la reacción. A continuación, la extracción se efectuó utilizando ACN (1% ácido fórmico), aplicando después distintos tiempos de agitación para favorecer la reacción (1-2 h) (datos no mostrados). Finalmente, la reacción de derivatización se llevó a cabo durante toda la noche. Los resultados pusieron de manifiesto que las recuperaciones más altas se obtenían utilizando 2 g de muestra, agitando durante 1 h y aplicando las etapas de hidrólisis, extracción y derivatización de forma independiente. Sin embargo, los valores de recuperación obtenidos para NP-SEM permanecían alrededor del 50% (Tabla 5).

A fin de aumentar las recuperaciones y disminuir la dilución a la que se sometía a las muestras, se agregó una etapa adicional de concentración después de centrifugar, evaporando los sobrenadantes resultantes a la mitad de volumen en un evaporador rotatorio. En general, se obtuvieron picos cromatográficos con formas aceptables y alta intensidad. No obstante, la determinación de NP-SEM continuó siendo problemática en la mayoría de los casos, mientras que para NP-AHD las recuperaciones excedían el 120% (datos no mostrados).

Tabla 5. Porcentajes de recuperación obtenidos aplicando diferentes procedimientos de extracción.

	Extracción con ACN (1% ácido fórmico)						Extracción con MeOH (1% ácido fórmico)	
	Hidrólisis + Extracción ^a	Hidrólisis + Derivatización ^b	Hidrólisis/Extracción/ Derivatización ^c		QuEChERS citrato		QuEChERS citrato	
					Dilución 1:10 ^d	Dilución 1:1	Dilución 1:10	Dilución 1:1
Concentración (µg/kg)	100	200	100	250	100	100	100	100
Compuesto	%Recuperación (% RSD) ^e	%Recuperación (% RSD) ^e	%Recuperación (% RSD)		%Recuperación (% RSD)		%Recuperación (% RSD)	
NP-AOZ	106 (29)	36 (3)	70 (3)	87 (5)	109 (58)	54 (45)	86 (35)	52 (5)
NP-AMAZ	102 (16)	29 (1)	104 (2)	99 (6)	96 (7)	24 (23)	77 (35)	56 (11)
NP-SEM	N.E. ^f	13 (21)	47 (43)	58 (21)	>120 (78)	>120 (81)	86 (47)	86 (49)
NP-AHD	118 (69)	>120 (1)	99 (8)	97 (12)	57 (14)	18 (16)	107 (35)	73 (1)

^aLas etapas de hidrólisis y extracción se llevaron a cabo simultáneamente.^bLa hidrólisis y la derivatización se aplicaron simultáneamente.^cLa hidrólisis, la extracción y la derivatización se llevaron a cabo en este orden, por separado.^dDilución en v/v.^eRSD: Desviación estándar relativa.^fN.E.: No extraído.

En consecuencia, para mejorar la eficiencia de la extracción y así, incrementar los valores de recuperación, se probaron tres disolventes de extracción diferentes: ACN, acetato de etilo y MeOH acidificados todos ellos con ácido fórmico al 1%. El acetato de etilo proporcionó los peores resultados de recuperación, obteniéndose formas irregulares en los picos (datos no mostrados) y el uso de MeOH no mejoraba significativamente los resultados obtenidos con ACN.

A continuación, se evaluó el método QuEChERS (acrónimo de rápido, fácil, barato, efecto, robusto y seguro) para mejorar los resultados obtenidos con los métodos previamente aplicados y obtener extractos más limpios. Con este propósito se utilizó tanto la metodología basada en el uso de tampón citrato (método oficial por la Norma Europea) [77, 78], como el procedimiento que utiliza tampón acetato (método oficial de la AOAC) [79, 80]. En este mismo experimento, después de la reacción de derivatización, se realizaron diluciones 1:10, 1:5 y 1:1 de los extractos con fase móvil (MeOH: formiato amónico 10 mM, 50:50, v/v), previamente a la inyección en el sistema cromatográfico; esto se hizo con el objetivo de reducir el efecto de supresión

iónica de la matriz y mejorar la eficiencia de ionización. Sin embargo, la forma de pico para el NP-SEM era inadecuada, mientras que para el resto de compuestos se obtuvieron valores de recuperación excesivamente altos con el método QuEChERS de tampón acetato (datos no mostrados). En el caso del método de las sales de citrato, se obtuvieron unos resultados más aceptables, pero no totalmente satisfactorios, con elevados valores de RSD (Tabla 5).

En vista de los resultados obtenidos, se descartaron los métodos QuEChERS y la dilución con fase móvil, seleccionándose ACN como disolvente de extracción, aplicando una etapa de concentración y llevando a cabo la hidrólisis, la extracción y la derivatización por separado. Aplicando estas condiciones, se sometieron a prueba diferentes etapas de limpieza antes de inyectar los extractos en el sistema cromatográfico.

Así pues, con el objetivo de eliminar los lípidos y la turbidez de la muestra y reducir los LOQs del método, se evaluó la utilización de *n*-hexano, ciclohexano y Florisil con C18 a muestras fortificadas (1 y 25 µg/kg). Sin embargo, la sensibilidad observada a bajos niveles de fortificación (1 µg/kg) continuó siendo insuficiente, mientras que a 25 µg/kg, la reproducibilidad (precisión inter-día) obtenida del método no fue adecuada (Figura 19).

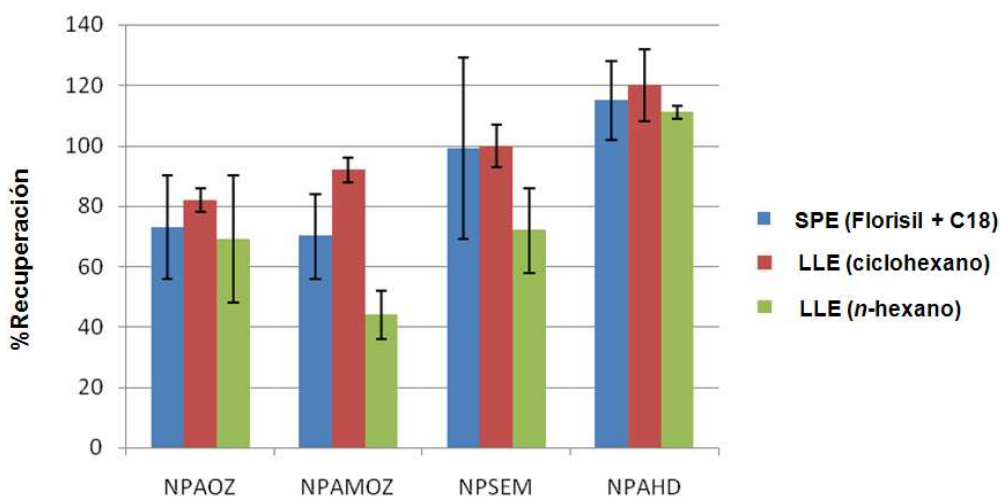


Figura 19. Influencia del tipo de limpieza sobre la recuperación (muestra de gamba fortificada a 25 µg/kg), correspondiendo las barras de error a 3 réplicas de muestras fortificadas.

➤ Optimización del procedimiento de SPE

Como medida correctora a los resultados anteriores, se introdujo la aplicación de una etapa de SPE después de la SLE con ACN, utilizando dos tipos de cartuchos: C18 y OASIS HLB, a fin de aplicar simultáneamente una preconcentración y una limpieza de la muestra. Para estas experiencias, se trabajó con muestras fortificadas a 1 y 25 $\mu\text{g/kg}$. En primer lugar, se aplicó un acondicionamiento de los cartuchos con ACN y se recogieron los extractos resultantes de pasar la muestra y los eluidos posteriormente con MeOH, para evaluar si los compuestos quedaban o no retenidos en el sorbente (*Método SPE 1*, Figura 20).

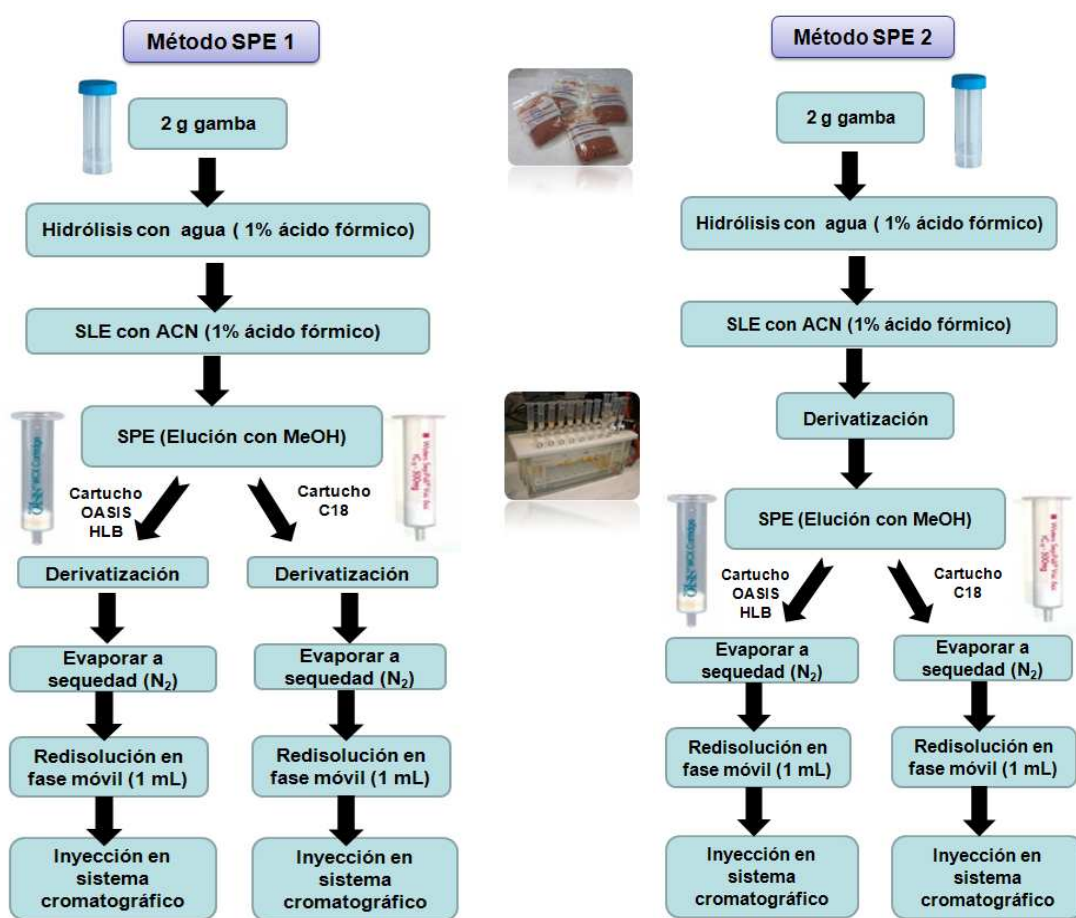


Figura 20. Esquema de los diferentes pasos a seguir en los métodos de SPE 1 y 2 aplicados.

Los resultados mostraron que, en su mayor parte, los compuestos no quedaban retenidos en los cartuchos. Sin embargo, las recuperaciones obtenidas fueron bajas, probablemente debido a que también aparecían restos de los metabolitos en los extractos eluidos, aunque no en proporción suficiente para cuantificar (Figura 21).

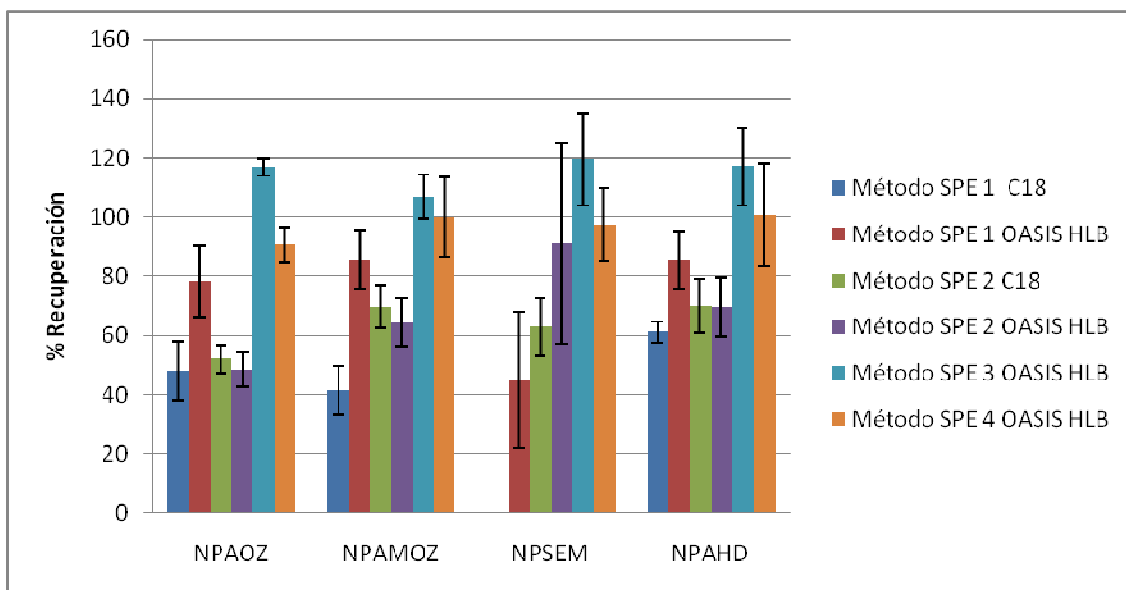


Figura 21. Recuperaciones obtenidas aplicando distintos procedimientos de SPE con un nivel de fortificación de 25 µg/kg, considerándose 3 réplicas para obtener las barras de error.

En consecuencia, se decidió derivatizar los metabolitos de los nitrofuranos después de la SLE y antes de realizar la SPE, puesto que esta reacción modifica la polaridad de los compuestos, haciéndolos más apolares, y podría afectar, por tanto, a sus propiedades de retención en el sorbente (*Método SPE 2*, Figura 20). No obstante, esta modificación en el procedimiento no ofreció la mejora esperada en los resultados obtenidos, persistiendo el problema anterior (Figura 21).

Finalmente, se pensó que la reacción de hidrólisis podría alterar el pH de la muestra, modificar el comportamiento ácido-base de los compuestos y por tanto, afectar a su comportamiento de retención durante la SPE, por lo que se introdujeron cambios relevantes en el procedimiento. En primer lugar, se aplicó una etapa de hidrólisis y derivatización simultánea (con HCl y 2-NBA, respectivamente), ajustándose después el pH a aproximadamente 7 con hidrógeno fosfato de di-sodio y NaOH. Por último, tras centrifugar, se llevó a cabo la SPE (cartucho OASIS HLB, con etapas de acondicionamiento de los cartuchos, lavado, secado y elución), utilizando como eluyente acetato de etilo. Empleando esta metodología, se sometieron a análisis distintas cantidades de muestra: 2.5 g (*Método SPE 3*, Figura 22) y 4 g (*Método SPE 4*, Figura 22), para evaluar el efecto en los resultados del aumento del factor de concentración.

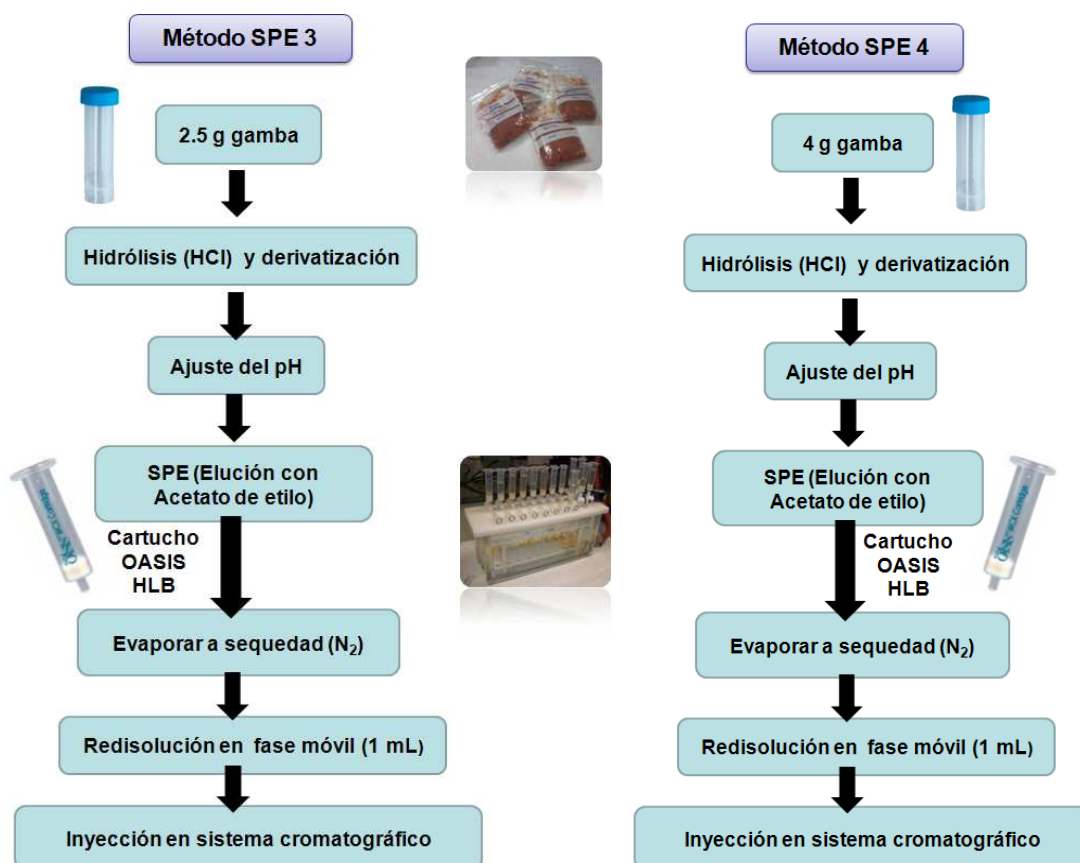


Figura 22. Esquema de los diferentes pasos a seguir en los métodos de SPE 3 y 4 aplicados.

Finalmente, comparando el Método SPE 3 y el 4, los mejores resultados se obtuvieron utilizando 2.5 g de muestra (Figura 21), es decir, teniendo un extracto con una menor concentración de los analitos, pero también una menor carga de matriz.

En resumen, se llegó a la conclusión de que el mejor método era el que aplicaba una limpieza con SPE Oasis HLB y utilizaba 2.5 g de muestra (Método SPE 3). Con este procedimiento (descrito detalladamente en el *Apartado 3.3.*), la totalidad de los metabolitos derivatizados quedó retenida en el sorbente y se obtuvieron los mejores resultados de todas las pruebas llevadas a cabo, con lo cual se estableció como metodología definitiva a seguir para el tratamiento y extracción de las muestras de gambas (Figura 23).

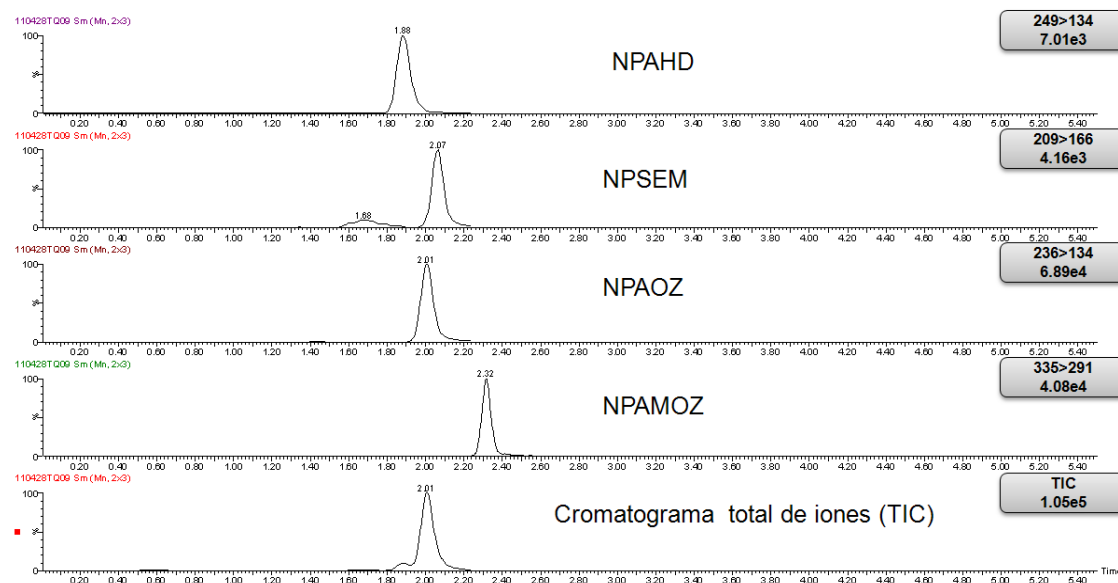


Figura 23. Cromatogramas SRM de una muestra de gamba fortificada a 25 µg/kg, tras aplicar el procedimiento de extracción optimizado (*Método SPE 3*, OASIS HLB)

4.3. Validación del método analítico mediante UHPLC-QqQ-MS/MS

Una vez desarrollado el método analítico, se procedió a la validación de éste, sometiéndose a estudio parámetros como: selectividad, efecto matriz, linealidad, veracidad (expresada como recuperación), precisión intra-día e inter-día (expresadas como RSD), y límites de detección (LODs) y cuantificación (LOQs).

- **Selectividad**

Por último, para evaluar la selectividad del método se utilizaron blancos de las muestras, observándose la ausencia de señales al mismo tiempo de retención de los analitos de interés. Debido a esto, se concluyó que el método era selectivo ya que no existían interferencias procedentes de la señal que pudieran originar un falso positivo.

- **Identificación de los compuestos**

En UHPLC-QqQ-MS/MS, la identificación de los compuestos se llevó cabo utilizando ventanas de tiempo de retención (VTRs), definidas como el promedio del

tiempo de retención (t_R), ± 3 veces la desviación estándar (SD) del t_R ($t_R \pm 3SD$), inyectando patrones en matriz de 1 a 50 $\mu\text{g/kg}$ (Tabla 2).

- **Evaluación del efecto matriz**

Las matrices alimentarias son muy complejas constituidas por un amplio número de compuestos que pueden interferir en la medida de la señal del analito, fenómeno que se conoce como efecto matriz. En LC-MS/MS, cuando se utiliza una fuente de ionización de ESI, la ionización de los analitos puede verse afectada, en menor o mayor grado, por procesos de competencia debido a la presencia de los constituyentes de la matriz. Como consecuencia de esto, puede producirse un aumento o una reducción de la señal de los analitos en comparación con la señal obtenida de los patrones en disolvente (Figura 24).

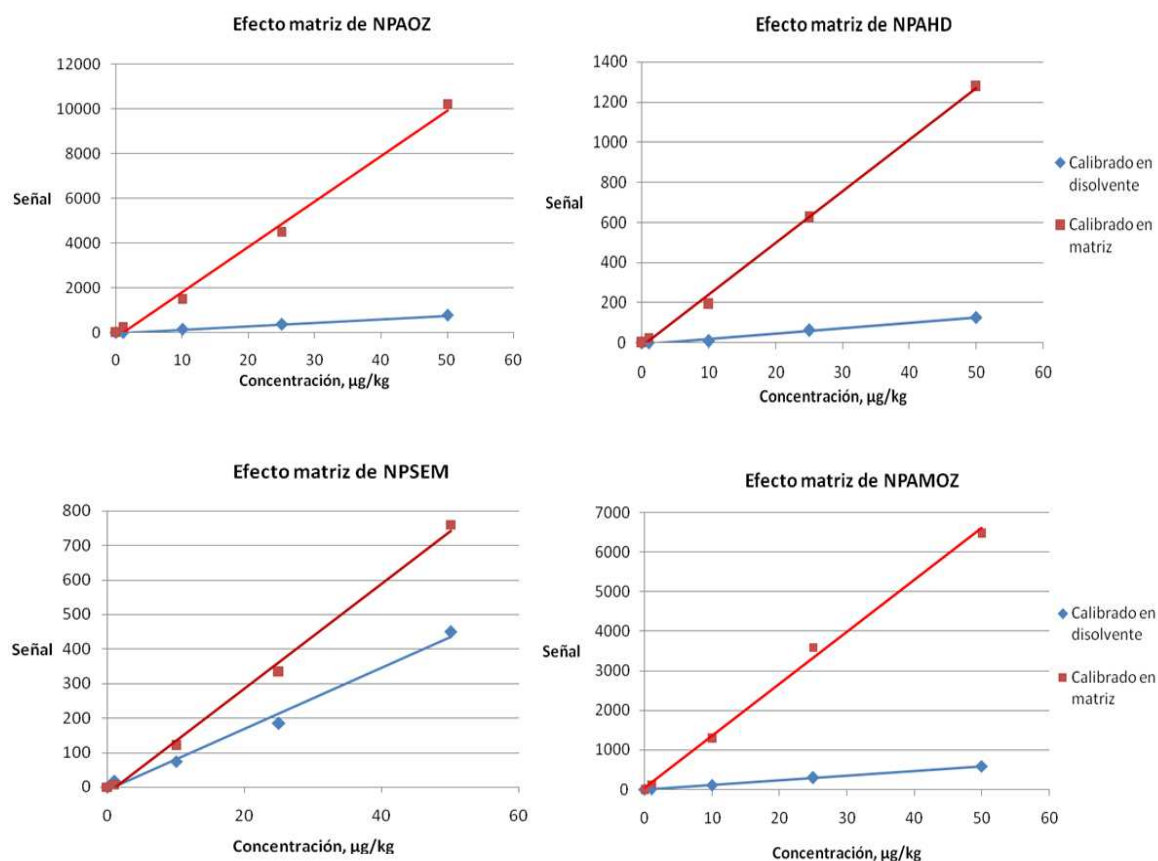


Figura 24. Representación de las rectas de calibrado para los cuatro metabolitos de los nitrofuranos derivatizados en disolvente y en matriz.

El efecto matriz fue estudiado mediante el análisis de disoluciones de los patrones en disolvente (desde 1 a 50 $\mu\text{g/kg}$) y patrones en matriz preparados con extractos blancos de gamba a los mismos valores de concentración. Las rectas de calibrado obtenidas en ambos casos resultaron ser significativamente diferentes en el caso de los cuatro

metabolitos de los nitrofuranos derivatizados, NPAOZ, NPAMOZ, NPSEM y NPAHD (Figura 24), confirmándose la presencia de efecto matriz, que originaba un aumento considerable de la señal analítica. Por tanto, para tratar de corregir el efecto matriz en la medida de lo posible, la cuantificación se llevó a cabo utilizando calibración en matriz (*matrix-matched standard calibration*).

- **Linealidad**

La linealidad fue estudiada en el rango de trabajo de 1-50 µg/kg. Los gráficos de calibración lineal se llevaron a cabo por mínimos cuadrados, representando el área de pico frente a la concentración de los patrones de calibración y obteniéndose valores del coeficiente de determinación (R^2) dentro del intervalo de 0.9942 (NPAOZ) a 0.9975 (NPAHD) (Tabla 6).

- **Veracidad**

La veracidad del método fue evaluada mediante las recuperaciones obtenidas de las muestras fortificadas a dos niveles de concentración, 1 µg/kg (excepto para NPSEM) y 25 µg/kg (Tabla 6).

Tabla 6. Recuperaciones obtenidas y parámetros de validación del método analítico.

Compuesto	Linealidad (R^2)	Rango lineal (µg/kg)	% Recuperación (RSD intra-día, %) ¹		RSD inter-día (%) ²		LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
			1 µg/kg	25 µg/kg	1 µg/kg	25 µg/kg		
NPAOZ	0.9942	1-50	98 (13)	70 (5)	13	9	0.05	1
NPAMOZ	0.9969	1-50	104 (14)	79 (6)	14	11	0.05	1
NPSEM	0.9956	5-50	N.E.	83 (3)	-	7	0.43	5
NPAHD	0.9975	1-50	99 (15)	84 (6)	15	7	0.2	1

¹ n = 3.

² n = 4.

Así, aplicando el método optimizado se obtuvieron valores de recuperaciones en el rango 60-120% en todos los casos (Tabla 6), exceptuando el metabolito NPSEM a 1 µg/kg, ya que para este compuesto, el método no pudo validarse a este nivel de fortificación tan bajo debido a una falta de sensibilidad en la detección instrumental.

- ***Precisión***

La precisión fue estudiada en términos de repetibilidad (precisión intra-día) y reproducibilidad (precisión inter-día), expresadas ambas como RSD (%). Para el estudio de la repetibilidad se utilizaron blancos de muestras fortificadas a diferentes niveles de concentración (1 y 25 µg/kg, $n = 3$) en un mismo día. Por otro lado, el estudio de la reproducibilidad se basó en el análisis de 3 blancos de muestras fortificadas sometidos a extracción 4 días diferentes. Para todos los compuestos y niveles evaluados, se obtuvieron valores inferiores o iguales al 15 %.

- ***Límites inferiores***

Para la estimación de los LOQs y LODs se sometieron a análisis blancos de gambas fortificados de manera que los límites calculados pueden considerarse como límites de detección y cuantificación del método (MDL y MQL). Se definieron el LOQ y el LOD como aquella mínima concentración de analito capaz de generar una relación señal ruido (S/N) de 10 y de 3, respectivamente (Tabla 6). Los LODs obtenidos oscilaron entre 0.05 y 0.43 µg/kg, observándose los menores valores para NPAOZ y NPAMOZ y el valor más elevado para NPSEM. En lo referente a los LOQs del método, se establecieron a 1 µg/kg para todos los compuestos (excepto para el NPSEM), a fin de facilitar los posteriores controles de calidad. En el caso particular de NPSEM, se fijó un LOQ de 5 µg/kg, puesto que a un nivel de fortificación de 1 µg/kg, se obtuvo una señal significativamente diferente de la señal de un blanco, pero de baja intensidad, lo que impidió poder cuantificar este compuesto a esta baja concentración.

5. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones extraídas de este trabajo se enumeran a continuación:

- Se ha desarrollado y optimizado un método para la determinación de nitrofuranos en gambas que incluye derivatización, extracción y limpieza de las muestras para su posterior análisis por UHPLC-QqQ-MS/MS.
- La linealidad del método analítico en el rango de trabajo seleccionado (1-50 µg/kg para todos los compuestos excepto para NPSEM) es adecuada, pues se han obtenido valores de R^2 superiores a 0.9900 en todos los casos.
- Los valores de RSD (<20%) obtenidos durante la validación del método, permiten la determinación fiable de los compuestos a concentraciones iguales o superiores a 1 µg/kg (excepto para NPSEM). Se trata por tanto, de un método preciso.
- Las recuperaciones obtenidas están englobadas en el rango de 60-120%, por lo que podemos concluir que el método desarrollado es veraz.
- Para NPAOZ, NPAMAZ y NPAHD, el LOQ obtenido permite cuantificar a 1 µg/kg, cumpliéndose por tanto, el MRPL fijado a 1 µg/kg por la UE para estos tres metabolitos.

6. PROPUESTAS PARA LA CONTINUACIÓN DEL TRABAJO

Para finalizar, y tras haber evaluado los resultados y las conclusiones de este trabajo, se proponen una serie de objetivos que podrían tratar de cumplirse en el futuro a partir del presente método analítico desarrollado:

- ✓ Continuación de la optimización del método de extracción para lograr conseguir una mayor sensibilidad y una cuantificación eficiente por debajo de 1 µg/kg para todos los compuestos, y al menos de 1 µg/kg para NPSEM. Cumpliendo este objetivo, se podrían llevar a cabo análisis a concentraciones inferiores a los niveles establecidos por la legislación.
- ✓ Aplicación del método desarrollado a muestras reales de gambas, adquiridas de diversos supermercados de la provincia de Almería.
- ✓ Evaluación de la eficacia y aplicabilidad del método (validado con muestras de gambas) para el análisis de otros productos alimenticios del mar, tales como trucha y salmón.

7. REFERENCIAS

-
- [1] <http://www7.taosnet.com/platinum/data/index2.html> (último acceso julio 2011).
- [2] F. Cañada-Cañada, A. M. de la Peña, A. Espinosa-Mansilla, *Analysis of antibiotics in fish samples*, Review, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 395 (2009) 987-1008.
- [3] V.F. Samanidou, E. N. Evaggelopoulou, *Analytical strategies to determine antibiotic residues in fish*, Review, Journal of Separation Science, 30 (2007) 2549-2569.
- [4] https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/index.cfm?event=notificationsList&orderby=notif_date&orderDir=desc
- [5] http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/index_en.htm
- [6] Annual Report 2009, *The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF)*, Directorate-General for Health & Consumers, European Commission, 1830-7302.
- [7] M. Vass K. Hruska, M. Franek, *Nitrofurantoin antibiotics: a review on the application, prohibition and residual analysis*, Veterinarni Medicina, 53 (2008) 469-500.
- [8] Fortieth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food, World Health Organization, Geneva, WHO-TRS 832 (1993).
- [9] A. A. M. Stolker, U. A. Th. Brinkman, *Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals-a review*, Journal of Chromatography A, 1067 (2005) 15-53.
- [10] J. Barbosa, M.L. Ferreira, F. Ramos, M. I. N. da Silveira, *Determination of the furaltadone metabolite 5-methylmorpholino-3-amino-2-oxazolidinone (AMOZ) using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry during the nitrofurantoin crisis in Portugal*, Accreditation and Quality Assurance, 12 (2007) 543-551.
- [11] A. Gentili, D. Perret, S. Marchese, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products*, Trends in Analytical Chemistry, 24 (2005) 704-733.
- [12] Reglamento (CEE) N° 2901/93 del Consejo de 18 de Octubre de 1993 que modifica los Anexos I, II, III y IV del Reglamento (CEE) n° 2377/90 por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, N° L 264/1.
- [13] Reglamento (CE) n° 1442/95 de la Comisión, de 26 de junio de 1995, por el que se modifican los Anexos I, II, III y IV del Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los animales de origen animal. Disponible en http://eur-lex.europa.eu/smartapi/cgi/sga_doc?smartapi!celexapi!prod!CELEXnumdoc&numdoc=31995R1442&mod=guichett&lg=en (último acceso julio 2011).

-
- [14] A. Di Corcia, M. Nazzari, *Liquid chromatographic-mass spectrometry methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products*, Review, Journal of Chromatography A, 974 (2002) 53-89.
- [15] <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v31je07.htm> (último acceso julio 2011).
- [16] <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v31je06.htm> (último acceso julio 2011)
- [17] [http://www.inchem.org/documents/iarc/vol07/5-\(morpholinomethyl\)-3-\(5.html](http://www.inchem.org/documents/iarc/vol07/5-(morpholinomethyl)-3-(5.html) (último acceso julio 2011)
- [18] <http://www.inchem.org/documents/pims/pharm/pim377.htm> (último acceso julio 2011)
- [19] L. A. P. Hoogenboom, G. D. van Bruchem, K. Sonne, I. C. Enniga, J. A. van Rhijn, H. Heskamp, M. B. M. Huveneers-Oorsprong, J. C. M. van der Hoeven, H. A. Kuiper, *Absorption of a mutagenic metabolite released from protein-bound residues of furazolidone*, Environmental Toxicology and Pharmacology, 11 (2002) 273-287.
- [20] H. H. Ahmed, S. H. A. El-Aziem, M. A. Andel-Wahhab, *Potencial role of cysteine and methionine in the protection against hormonal imbalance and mutagenicity induced by furazolidone in female rats*, Toxicology, 243 (2008) 31-42.
- [21] European Food Safety Authority: Opinion of the Scientific Panel on Food Additives, Flavourings, Processing Aids and Materials in Contact with Food on a request from the Commission related to Semicarbazide in Food. The EFSA Journal, 219 (2005) 1-36.
- (Disponible en: <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/219.pdf>, último acceso julio 2011).
- [22] P. L. Bosquesi, A. E. Almeida, L. Blau, R. F. Menegon, J. L. Santos, M. C. Chung, Toxicidade de fármacos nitrofurânicos, Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 29, n.3 (2008) 231-238.
- [23] F. Kari, Ph. D., Chemical Manager, *NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of nitrofurazone*, National Toxicology Program, June 1988.
- [24] A. Garrido Frenich, P. Plaza-Bolaños, M. M. Aguilera-Luiz, J. L. Martínez-Vidal, *Chromatography Types, Techniques and Methods, Chapter 1: Recent advances in the analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents by chromatographic techniques* (2009), p. 1.
- [25] S. Effkemann, F. Feldhusen, *Triple-quadrupole LC-MS-MS for quantitative determination of nitrofurantoin metabolites in complex food matrixes*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 378 (2004) 842-844.
- [26] Reglamento (CEE) nº 2377/90 del Consejo, de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L224 (1990) 1.
- [27] Reglamento (UE) nº 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009 relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L15 (2010) 1.
- [28] Informe de la decimonovena reunión del comité del Codex sobre residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos, programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, Comisión del Codex Alimentarius (2010). Disponible en: <http://www.codexalimentarius.net/web/archives.jsp?lang=en> (último acceso julio 2011)
-

- [29] Compendio de métodos de análisis identificados como idóneos para respaldar los LMR del Codex. Disponible en: http://www.codexalimentarius.net/mrls/vetdrugs/vetd_ref/MAS-RVDF_2006_s.pdf
- [30] Department of health and human services, Food and Drug Administration. Topical Nitrofurans; Extralabel Animal Drug Use; Order of Prohibition, Rules and Regulations, Federal Register, 67 (2002) 5470-5471.
- [31] http://www.oehha.ca.gov/prop65/prop65_list/Newlist.html (último acceso julio 2011).
- [32] 2003/181/CE: Decisión de la Comisión, de 13 de marzo de 2003, por la que se modifica la Decisión 2002/657/CE en cuanto al establecimiento de límites mínimos de funcionamiento exigidos (MRPL) para determinados residuos en alimentos de origen animal, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L71 (2003) 17.
- [33] Reglamento (CE) n° 1756/2002 del Consejo, de 23 de septiembre de 2002, por el que se modifica la Directiva 70/524/CEE del Consejo sobre los aditivos en la alimentación animal en lo que respecta a la retirada de la autorización de un aditivo y el Reglamento (CE) n° 2430/1999 de la Comisión, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L265 (2002).
- [34] P. S. Chu, M. I. Lopez, *Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of protein-bound residues in shrimp dosed with nitrofurans*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53 (2005) 8934-8939.
- [35] P. Viñas, N. Campillo, L. Carrasco, M. Hernández-Córdoba, *Analysis of nitrofurans residues in animal feed using liquid chromatography and photodiode-array detection*, Chromatographia, 65 (2007) 85-89.
- [36] P. S. Chu, M. I. Lopez, A. Abraham, K. R. El Said, S. M. Plakas, *Residue depletion of nitrofurans drugs and their tissue-bound metabolites in channel catfish (Ictalurus punctatus) after oral dosing*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56 (2008) 8030-8034.
- [37] A. Conneely, A. Nugent, M. O'Keeffe, *Use of solid phase extraction for the isolation and clean-up of a derivatised furazolidone metabolite from animal tissues*, The Analyst, 127 (2002) 705-709.
- [38] E. Verdon, P. Couedor, P. Sanders, *Multi-residue monitoring for the simultaneous determination of five nitrofurans (furazolidone, furaltadone, nitrofurazone, nitrofurantoin, nifursol) in poultry muscle tissue through the detection of their five major metabolites (AOZ, AMOZ, SEM, AHD, DNSAH) by liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry – In-house validation in line with Commission Decision 657/2002/EC*, Analytica Chimica Acta, 586 (2007) 336-347.
- [39] A. Leitner, P. Zöllner, W. Lindner, *Determination of the metabolites of nitrofurans antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, 939 (2001) 49-58.
- [40] R. J. McCracken, D. G. Kennedy, *Determination of the furazolidone metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone, in porcine tissues using liquid chromatography-thermospray mass spectrometry and the occurrence of residues in pigs produced in Northern Ireland*, Journal of Chromatography B, 691 (1997) 87-94.
- [41] E. Horne, A. Cadogan, M. O'Keeffe, L. A. P. Hoogenboom, *Analysis of protein-bound metabolites of furazolidone and furaltadone in pig liver by high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry*, The Analyst, 121 (1996) 1463-1468.

-
- [42] A. Conneely, A. Nugent, M. O'Keeffe, P. P. J. Mulder, J. A. van Rhijn, L. Kovacsics, A. Fodor, R. J. McCracken, D. G. Kennedy, *Isolation of bound residues of nitrofurans from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometry detection*, *Analytica Chimica Acta*, 483 (2003) 91-98.
- [43] C. Cámara, P. Fernández, A. Martín-Esteban, C. Pérez-Conde, M. Vidal, *Toma y tratamiento de muestras*, Editorial Síntesis. Capítulo 6, 2002.
- [44] J. Barbosa, S. Moura, R. Barbosa, F. Ramos, M. I. Noroña da Silveira, *Determination of nitrofurans in animal feeds by liquid chromatography-UV photodiode array detection and liquid chromatography-ion spray tandem mass spectrometry*, *Analytica Chimica Acta*, 586 (2007) 359-365.
- [45] C. Bock, C. Stachel, P. Gowik, *Validation of a confirmatory method for the determination of residues of four nitrofurans in egg by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with the software InterVal*, *Analytica Chimica Acta*, 586 (2007) 348-358.
- [46] S. Khong, E. Gremaud, J. Richoz, T. Delatour, P.A. Guy, R. H. Stadler, P. Mottier, *Analysis of matrix-bound nitrofurans residues in worldwide-originated honeys by isotope dilution high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (2004) 5309-5315
- [47] P. Mottier, S. P. Khong, E. Gremaud, J. Richoz, T. Delatour, T. Goldmann, P. A. Guy, *Quantitative determination of four nitrofurans metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 1067 (2005) 85-91.
- [48] C. Bock, P. Gowik, C. Stachel, *Matrix-comprehensive in-house validation and robustness check of a confirmatory method for the determination of four nitrofurans metabolites in poultry muscle and shrimp by LC-MS/MS*, *Journal of Chromatography B*, 856 (2007) 178-189.
- [49] J.K. Finzi, J. L. Donato, M. Sucupira, G. De Nucci, *Determination of nitrofurans metabolites in poultry muscle and eggs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography B*, 824 (2005) 30-35.
- [50] P. S. Chu, M. I. Lopez, *Determination of nitrofurans residues in milk of dairy cows using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 2129-2135.
- [51] L. Rodziewicz, *Determination of nitrofurans metabolites in milk by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography B*, 864 (2008) 156-160.
- [52] K.M. Cooper, D. G. Kennedy, *Nitrofurans antibiotic metabolites detected at parts per million concentrations in retina of pigs-a new matrix for enhanced monitoring of nitrofurans abuse*, *The Analyst*, 130 (2005) 446-468.
- [53] C. W. Tsai, C.-H. Tang, W.-H. Wang, *Quantitative determination of four nitrofurans and corresponding metabolites in the fish muscle by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry*, *Journal of Food and Drug Analysis*, 18 (2010) 98-106.
- [54] T. Ding, J. Xu, C. Shen, K. Wang, *Determination of trace level nitrofurans metabolites in crawfish meat by electrospray LC-MS/MS on the Finnigan TSQ Quantum Discovery MAX*, LC-GC North America, 24 (2006) 49.
-

-
- [55] M. O'Keeffe, A. Connely, K. M. Cooper, D. G. Kennedy, L. Kovacsics, A. Fodor, P. P. J. Mulder, J. A. van Rhijn, G. Trigueros, *Nitrofurant antibiotic residues in pork The FoodBRAND retail survey*, *Analytica Chimica Acta*, 520 (2004) 125-131.
- [56] X. Xia, X. Li, S. Zhang, S. Ding, H. Jiang, J. Li, J. Shen, *Simultaneous determination of 5-nitroimidazoles and nitrofurans in pork by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 1208 (2008) 101-108.
- [57] L. Tribalat, O. Paisse, G. Dessalces, M.-F. Grenier-Loustalot, *Advantages of LC-MS-MS compared to LC-MS for the determination of nitrofurant residues in honey*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386 (2006) 2161-2168.
- [58] R. Draisci, L. Giannetti, L. Lucentini, L. Palleschi, G. Brambilla, L. Serpe, P. Gallo, *Determination of nitrofurant residues in avian eggs by liquid chromatography-UV photodiode array detection and confirmation by liquid chromatography-ionspray mass spectrometry*, *Journal of Chromatography A*, 777 (1997) 201-211.
- [59] M. J. G. García, M. C. Q. Mani, M. P. da Silva de Campos, *Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución*, Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Madrid, Ediciones UAM (2009). Capítulo 5, p.127.
- [60] W. M. A. Niessen, *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, Third Edition, CRC Press, Taylor & Francis (2006). Capítulo 1, p.3.
- [61] R. E. Adrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons (2003). Capítulo 2, p. 7.
- [62] M.J. G. García, M. C. Q. Mani, M. P. da Silva de Campos, *Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución*, Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Madrid, ediciones UAM (2009). Capítulo 3, p.37.
- [63] R. E. Adrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons (2003). Capítulo 2, p.10.
- [64] M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló, *Recent advances in LC-MS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment*, *Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 637-646.
- [65] X. Z. Hu, Y. Xu, A. Yediler, *Determinations of residual furazolidone and its metabolite, 3-amino-2-oxazolidinone (AOZ), in fish feeds by HPLC-UV and LC-MS/MS, respectively*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (2007) 1144-1149.
- [66] S. Chumanee, S. Sutthivaiyakit, P. Sutthivaiyakit, *New reagent for trace determination of protein-bound metabolites of nitrofurans in shrimp using liquid chromatography with diode array detector* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (2009) 1752-1759.
- [67] C. Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Wiley Interscience (2007). Capítulo 1, p. 5.
- [68] W. M. A. Niessen, *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, Third Edition, CRC Press, Taylor & Francis (2006). Capítulo 2, p.23.
- [69] R. E. Adrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons (2003). Capítulo 3, p. 36.
-

- [70] R. E. Adrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons (2003). Capítulo 4, p. 122.
- [71] Dass, *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, Wiley Interscience (2007). Capítulo 2, p. 48-54.
- [72] M. J. G. García, M. C. Q. Mani, M. P. da Silva de Campos, *Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución*, Servicio de Publicaciones de la Universidad Autónoma de Madrid, ediciones UAM (2009). Capítulo 3, p.92.
- [73] E. Hoffmann, V. Stroobant, *Mass Spectrometry. Principles and Applications*, Third Edition, John Wiley & Sons (2007). Capítulo 2, p.88.
- [74] R. E. Adrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons (2003). Capítulo 3, p.47.
- [75] G. Balizs, A. Hewitt, *Determination of veterinary drug residues by liquid chromatography and tandem mass spectrometry*, *Analytica Chimica Acta*, 492 (2003) 105-131.
- [76] http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/workdoc_2006_en.pdf. (último acceso julio 2010)
- [77] CEN Standard Method EN 15662: *Food of plant origin-determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/portioning and clean-up by dispersive SPE-QuECHERS method*. Disponible en <http://www.cen.eu>. (último acceso julio 2010).
- [78] S.J. Lehotay, K. Mastovska, S.J. Yun, *Journal of AOAC International* 88 (2005) 630-638.
- [79] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, *Journal of AOAC International* 86 (2003) 412-431
- [80] AOAC Official Method 2007.01. *Pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulphate*.